

Marzo 2023

## Aumento de casos por Dengue, Chikungunya y Zika



Diferentes países registran un aumento en los casos de enfermedades transmitidas por mosquitos del dengue y el chikungunya. Ecuador y Costa Rica están en alerta epidemiológica, mientras que Bolivia y Perú enfrentan una situación crítica con hospitales saturados y una posible declaración de emergencia sanitaria.

Los casos confirmados de estas enfermedades, se han duplicado en 2022 en comparación con el año anterior y se espera que esta tendencia continúe en 2023. (1)

En la figura 1 se observa el patrón de circulación de dengue, chikungunya y Zika en los últimos 15 años. Sin embargo, la circulación del dengue ha continuado predominando en el cuadro de las arbovirosis en la región. El 2022 es el tercer año de mayor registro en el número de casos de dengue, solo superado por los años 2016 y 2019 [2].

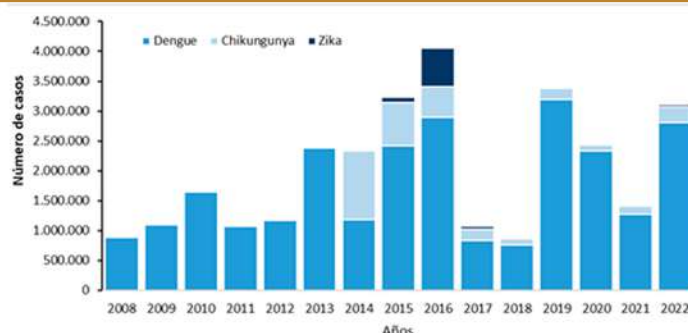


Figura 1. Distribución de casos de dengue, chikunguña y Zika por año de notificación. Región de las Américas, 2008-2022 (hasta la SE 52 de 2022).



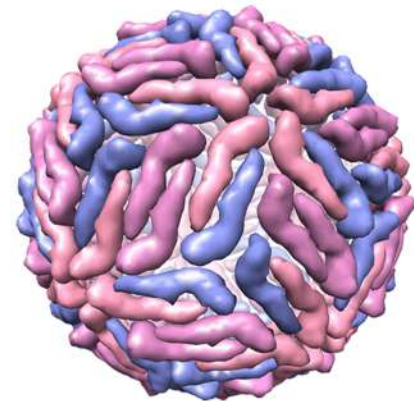
La Organización Panamericana de la Salud invita a los estados miembros, a hacer uso de los servicios de laboratorio como un componente clave de la vigilancia epidemiológica del dengue y mantener la detección y caracterización del virus para permitir la identificación precisa de las cepas del virus y su movimiento, para comprender su dinámica de propagación.

Esta información, permitirá diseñar estrategias efectivas de control y prevención y debe ser establecida como un componente esencial de los programas de salud pública en todo el mundo [3].



# Aportaciones ITRASIG

Debido a la importancia de mantener y actualizar los sistemas de diagnóstico del virus Dengue en función de las situaciones epidemiológicas, es esencial evaluar regularmente el desempeño de los protocolos de diagnóstico existentes y, si es necesario, implementar mejoras en su diseño.



Es por eso que el Instituto Traslacional de Singularidad Genómica (ITRASIG) ha propuesto una actualización en las secuencias de oligonucleótidos y sondas marcadas, utilizadas en la detección y discriminación de los cuatro serotipos del virus Dengue (DENV) descritos en el proyecto de vigilancia genómica del dengue en las Américas (ViGENDA) [4].

Nuestro departamento de BioData inició la actualización de las secuencias con el objetivo de mejorar su desempeño. Para lograrlo, nos enfocamos en la obtención de secuencias genómicas con la mayor representatividad posible de la diversidad genética del virus. Para ello, se descargaron 11,056 secuencias, incluyendo 49 secuencias correspondientes a los diferentes genotipos de cada serotipo de DENV de bases de datos como NCBI (National Center for Biotechnology Information por sus siglas en inglés), y de las filogenias contemporáneas publicadas en Real-time tracking of dengue virus evolution (NEXTSTRAIN) (figura 2), con un rango de temporalidad posterior al año 2016.

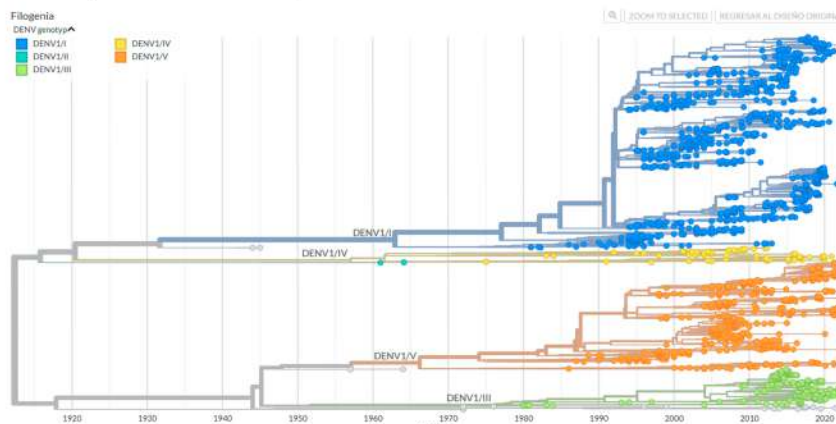


Figura 2. Filogenia representativa empleada para la obtención de secuencias representativas de todos los genotipos incluidos en cada serotipo del DENV.



# Aportaciones ITRASIG

Posterior a la clusterización de las secuencias, se realizaron alineamientos que permitieran analizar y evaluar dos características importantes;

- 1) Se busca mantener la representatividad de las degeneraciones originales en las secuencias.
- 2) Evaluar si es necesario introducir nuevas degeneraciones o modificar las existentes en las regiones correspondientes al forward, reverse y sonda de cada serotipo.

De esta manera, se garantiza una mayor precisión y fiabilidad en la detección y análisis de los serotipos en cuestión. A partir de los resultados obtenidos del análisis bioinformático se propuso incluir nuevas degeneraciones en las secuencias de primers y sondas debido a que, como se muestra en la figura 3, en esas posiciones, se encontraron mutaciones puntuales que pueden llegar a influir negativamente en el reconocimiento y alineamiento por parte de los primers y sondas y en consecuencia afectar la tipificación del virus.



Figura 3. Alineamiento representativo empleado en la actualización de las secuencias. Programa UGENE. Algoritmo de alineamiento: Muscle.

Las secuencias de primers y sondas originales y las actualizadas se muestran en la siguiente tabla:

	Originales	Actualización
DENV1-Fw	CAAAAGGAAGTCGYGCAATA	CAAAAGGAAGYCGYGCAATA
DENV1-Rv	CTGAGTGAATTCTCTCTGCTRAAC	CTGAGTGAATTCTCTCTRCTRAC
DENV1-Probe	CATGTGGYTTGGGAGCRGCG	GTACATGTGGYTTGGGAGRCRGY
DENV2-Fw	CAGGCTATGGCACYGTCACGAT	CAGGYTATGGCACYGTCACGAT
DENV2-Rv	CCATYTGACGARCAACCATCTC	CCATYTGACGARCAACCATYTC
DENV2-Probe	CTCYCCRAGAACGGGCTCGACTTCAA	CTCYCCRAGAACGGGMCTCGACTTCAA
DENV3-Fw	GGACTRGACACACGCACCCA	GGACTRGACACACGCRCCA
DENV3-Rv	CATGTCTCTACCTTCTCGACTTGCT	CATGTCTCTACCTTCTCRACTTGCT
DENV3-Probe	ACCTGGATGTCGGCTGAAGGAGCTTG	ACCTGGATGTCRGGCTGAAGGAGCTTG
DENV4-Fw	TTGTCTAATGATGCTRGTCG	TTGTCTAATGATGCTRGTCG
DENV4-Rv	TCCACCYGAGACTCCTTCCA	TCCACCYGAGACTCCTCCYA
DENV4-Probe	TYCCTACYCCTACGCATCGATTCCG	TYCCYACYCCTACGCATCGATTCCG

Tabla 1. Secuencias originales reportadas por Santiago GA et al. (2013) y propuesta de actualización de las mismas para la tipificación de DENV.



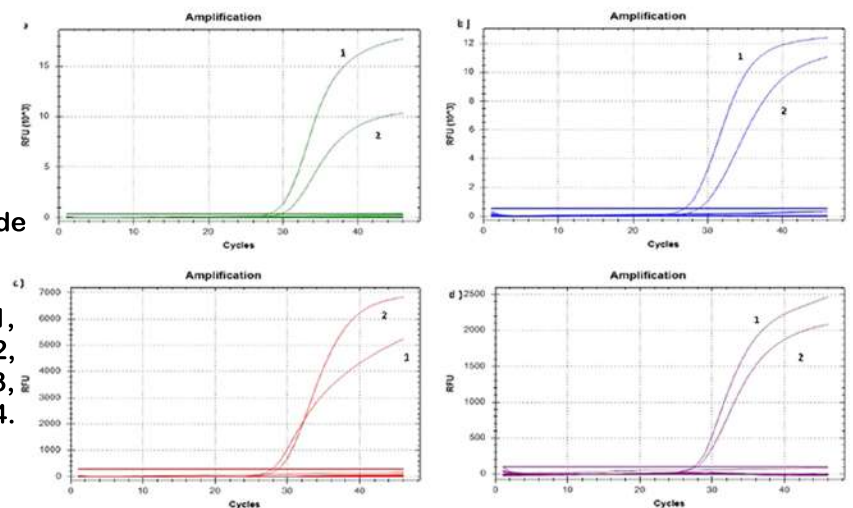
# Aportaciones ITRASIG

La evaluación del desempeño tanto de las secuencias originales como de la actualización de estas es crucial para asegurar la calidad y precisión de los análisis posteriores. Es importante tener en cuenta que, a medida que se generan nuevas secuencias y se actualizan las ya existentes, es necesario revisar y validar su desempeño en diferentes contextos y situaciones. De esta manera, se pueden identificar posibles errores o deficiencias en la metodología utilizada, y se pueden implementar mejoras y ajustes para optimizar el rendimiento y la eficiencia de las secuencias en cuestión. En resumen, la evaluación constante del desempeño de las secuencias es un elemento clave para garantizar la fiabilidad y utilidad de los resultados obtenidos.

Dicha evaluación se llevó a cabo, siguiendo sin modificación alguna, el protocolo de trabajo descrito por Santiago y colaboradores en el 2013. Los resultados de esta propuesta presentaron una mejora significativa en cuanto a la detección, como se puede observar en la figura 4, donde se muestra una reducción de un ciclo en el valor de ct (cycle threshold) para los serotipos DENV-1 y DENV-2, en comparación con las secuencias originales. Este hallazgo sugiere una mayor sensibilidad y eficacia en la detección de estos serotipos utilizando la actualización propuesta.

Figura 4. Curvas de amplificación correspondientes a material sintético de los cuatro serotipos de DENV a una concentración de  $1 \times 10^3$  copias/ $\mu$ L. 1 (propuesta de actualización ITRASIG), 2 (secuencias de referencia).

- a) comparación de amplificación para serotipo 1,
- b) comparación de amplificación para serotipo 2,
- c) comparación de amplificación para serotipo 3,
- d) comparación de amplificación para serotipo 4.



## Materiales Empleados

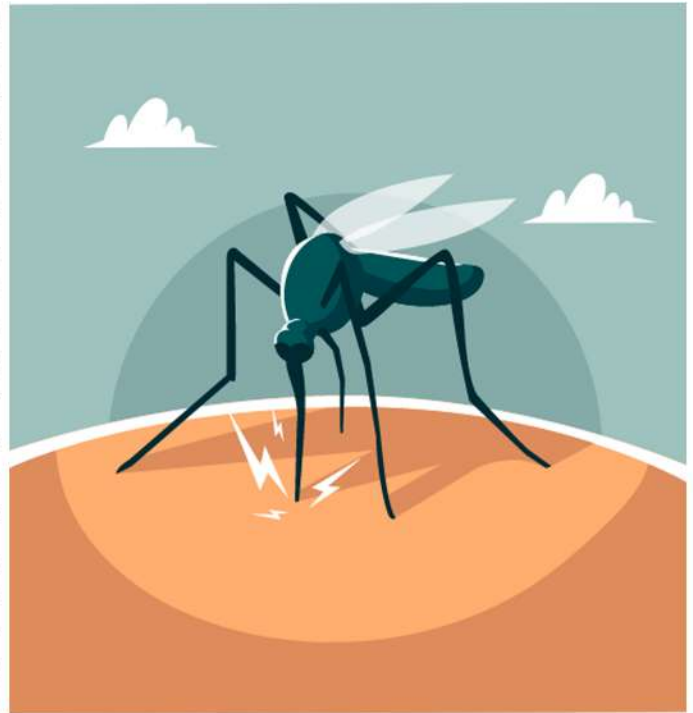
- El material biológico de referencia empleado consistió en ARN viral de los cuatro serotipos del virus dengue, proveniente de cultivo celular (células Vero y C6/36). Para los ensayos se utilizó el termociclador CFX96 Touch Deep Well Real-Time PCR Detection System de BioRad.
- La actualización de las secuencias no solo contempla la inclusión de una mayor diversidad genética analizada in silico, sino también una evaluación del desempeño de la detección de material sintético con una concentración conocida y ajustada a un número de  $1 \times 10^3$  copias/ $\mu$ L.



## Valor de la actualización

Aunque todavía no se han esclarecido por completo los mecanismos evolutivos que rigen al DENV, se han logrado estimar las tasas de evolución molecular de cada serotipo, a través del análisis de genes de la proteína de envoltura (E). Estas tasas de evolución molecular, tienen un impacto directo en la dinámica poblacional y epidemiológica del DENV. Por ejemplo, se ha observado que los serotipos 1 y 2 presentan una tasa de  $7.5 \times 10^{-4}$  s/s/y (sustituciones por sitio y por año por sus siglas en inglés), mientras que los serotipos 3 y 4 presentan tasas de  $8.2 \times 10^{-4}$  s/s/y y  $7.8 \times 10^{-4}$  s/s/y, respectivamente [5].

Los cambios en el genoma de los diferentes serotipos del DENV, generan diversidad genética, y como resultado, la aparición de variantes que pueden producir emergencias epidémicas. A nivel filogenético, estas variantes podrían pasar desapercibidas en los clados, que representan la evolución del virus. Sin embargo, el tiempo que transcurre entre la introducción de una variante "peligrosa" en una región y su detección, podría ser suficiente para que dichas nuevas variantes del virus permanezcan sin ser detectadas, hasta que el número de infecciones y/o la incidencia de enfermedades, alcance un umbral lo suficientemente alto para ser detectado por el sistema de vigilancia local [6]. Por lo tanto, la actualización constante de los métodos diagnósticos, es crucial para combatir enfermedades como el dengue y otras arbovirosis que afectan a las personas en todo



Para abordar los desafíos existentes en la vigilancia de laboratorio del dengue, y poder aportar información virológica al mapa genómico del virus, es imprescindible contemplar algunas características intrínsecas de la dinámica epidemiológica de DENV, por ejemplo, se ha observado un cambio rápido en la epidemiología del dengue, con brotes de enfermedad que ocurren con regularidad, recientes hallazgos, sugieren que la magnitud y el momento de estos brotes, están asociados con anomalías en el clima local, los serotipos del virus en circulación, y la abundancia del vector [7]. Además, se ha visto una disminución drástica en la frecuencia de un clado, o incluso el reemplazo total de algunos serotipos de virus, por ejemplo, la reciente introducción del genotipo Cosmopolita (DENV-2) en Perú (2019-2020) [8].

## Valor de la actualización

Para comprender mejor la dinámica epidemiológica de esta enfermedad, debemos considerar, además, la densidad de mosquitos infectados, la diversidad de los hospedadores, la replicación viral, las tasas de migración de los humanos y otras especies de hospedadores, así como la interacción entre el vector y el hospedador [9]. Al dilucidar escenarios más realistas e incrementar la eficiencia en el diagnóstico, podemos mejorar nuestra comprensión de las enfermedades transmitidas por vectores y desarrollar mejores estrategias de prevención, control y diagnóstico.

## Investigador



### Byron Galindo Ornelas

Biólogo egresado de la Universidad Nacional Autónoma de México, FES Iztacala. La obtención del título de licenciatura la realizó en el Laboratorio de Arbovirus y Virus Hemorrágicos del Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos en donde realizó estudios de genotipificación de los cuatro serotipos del Virus Dengue en la República Mexicana.

Actualmente forma parte del personal científico de ITRASIG, donde lleva a cabo la vigilancia genómica de enfermedades emergentes. Además, participa activamente en el desarrollo de herramientas para la atención de enfermedades contagiosas y no contagiosas de importancia social, aportando opiniones fundamentales en la ciencia y aterrizadas dentro de las necesidades epidemiológicas del país.



## Referencias

- 1) Organización Panamericana de la Salud / Organización Mundial de la Salud. (2023, 25 de enero). Actualización Epidemiológica: Dengue, chikunguña y Zika. Washington, D.C.: OPS/OMS.
- 2) Organización Panamericana de la Salud. (s.f.). OPS/OMS Data. Recuperado el 16 de marzo de 2023, de <https://www3.paho.org/data/index.php/es/>
- 3) Organización Panamericana de la Salud / Organización Mundial de la Salud. (2020, 10 de junio). Actualización Epidemiológica: Dengue. Washington, D.C.: OPS/OMS.
- 4) Santiago, G. A., Vergne, E., Quiles, Y., Cosme, J., Vazquez, J., Medina, J. F., ... & Muñoz-Jordán, J. L. (2013). Analytical and clinical performance of the CDC real time RT-PCR assay for detection and typing of dengue virus. *PLoS neglected tropical diseases*, 7(7), e2311. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002311>
- 5) Costa, R. L., Voloch, C. M., & Schrago, C. G. (2012). Comparative evolutionary epidemiology of dengue virus serotypes. *Infection, Genetics and Evolution*, 12, 309-314.
- 6) de Souza, R. P., Rocco, I. M., Maeda, A. Y., Spenassatto, C., Bisordi, I., Suzuki, A., et al. (2011). Dengue virus type 4 phylogenetics in Brazil 2011: looking beyond the veil. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 5, e1439. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001439> PMID: 22216365.
- 7) Stewart Ibarra AM, Lowe R (2013). Climate and non-climate drivers of dengue epidemics in southern coastal Ecuador. *Am J Trop Med Hyg*, 88: 971-981. 10.4269/ajtmh.12-0478.
- 8) García MP, Padilla C, Figueroa D, Manrique C, Cabezas C. (2022). Emergencia del genotipo Cosmopolitano del virus dengue serotipo 2 (DENV2) en Madre de Dios, Perú, 2019. *Rev Peru Med Exp Salud Publica*, 39(1), 126-128. <https://doi.org/10.17843/rpmesp.2022.391.10861>.
- 9) Tuladhar, R., Singh, A., Varma, A., & Choudhary, D. K. (2019). Climatic Factors Influencing Dengue Incidence in an Epidemic Area of Nepal. *BMC Res. Notes*, 12, 131.

