

ARTÍCULO ORIGINAL

Virus del dengue de serotipo 1 (DENV-1) de Colombia: su contribución a la presentación del dengue en el departamento de Santander

Raquel E. Ocazonez-Jiménez¹, Ayda Susana Ortiz-Báez², Sergio Yebraíl Gómez-Rangel¹, Daniel R. Miranda-Esquivel²

¹ Laboratorio de Arbovirus, Centro de Investigaciones en Enfermedades Tropicales, Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, Colombia

² Laboratorio de Sistemática y Biogeografía, Escuela de Biología, Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, Colombia

Introducción. Los cuatro serotipos del virus del dengue circularon en el departamento de Santander entre 1998 y 2008. No existe información sobre el papel del serotipo 1 (DENV-1) en la epidemiología de la enfermedad.

Objetivo. Analizar la relación entre el cambio de predominancia del (DENV-1) con su diversificación genética, predominancia de los otros serotipos y presentación del dengue grave.

Materiales y métodos. La diversificación genética se estudió por análisis filogenético usando la secuencia del gen E de 12 cepas del virus. Para el análisis se utilizaron datos sobre predominancia de los serotipos obtenidos en estudios previos y datos oficiales de incidencia del dengue.

Resultados. Los virus seleccionados se agruparon en el genotipo V junto a (DENV-1) de países de Latinoamérica y se evidenció segregación en cuatro linajes. Los cambios en la predominancia del virus coincidieron con el reemplazo de linaje y esto, a su vez, con incremento en la prevalencia de DENV-2 y DENV-3, e incremento del dengue grave.

Conclusión. La diversificación genética podría contribuir a cambios de predominancia de (DENV-1), y la relación del virus con el DENV-2 y DENV-3 en situaciones que favorecen la presentación de casos graves. Se necesitan más estudios para precisar el papel de los serotipos en la epidemiología del dengue.

Palabras clave: dengue, virus del dengue, genotipo, diversidad genética, epidemiología.

doi: <http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v33i0.717>

Dengue virus serotype 1 (DENV-1) from Colombia: its contribution to dengue occurrence in Santander

Introduction: Between 1998 and 2008 all dengue virus serotypes circulated in the Departamento de Santander, an endemic region in northeastern Colombia. No information is available as to the role of serotype 1 (DENV-1) with respect to epidemiology of dengue.

Objective: To analyze the relationship between changes in DENV-1 predominance with respect to genetic diversity, prevalence of others serotypes and occurrence of severe dengue.

Methods: Virus genetic diversity was studied by phylogenetic analysis comparing E gene sequences from 12 viral strains. Data about serotypes predominance obtained in previous studies and official data about dengue incidence were used for analysis.

Results: Selected viruses grouped into genotype V together DENV-1 from Latin America countries, and segregation in four lineages was evidenced. Changes in virus predominance coincided with replacement of lineage, increase in prevalence of DENV-2 and DENV-3 and increase of severe dengue.

Conclusion: Genetic divergence could have contributed to changes in DENV-1 predominance. The relationship of the virus with DENV-2 and DENV-3 could create scenarios that promote occurrence of severe cases. More studies are required to ascertain the precise role of serotypes in the epidemiology of dengue.

Keywords: dengue, dengue virus, genotype, genetic variation, epidemiology.

doi: <http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v33i0.717>

Contribución de los autores:

Raquel E. Ocazonez-Jiménez: diseño del estudio, análisis de datos y escritura del manuscrito.

Ayda Susana Ortiz-Báez: amplificación de secuencias genómicas y análisis filogenético.

Sergio Yebraíl Gómez-Rangel: aislamientos virales, análisis de datos y revisión del manuscrito.

Daniel R. Miranda-Esquivel: análisis filogenético y escritura del manuscrito.

El virus del dengue (DENV) es el agente patógeno más abundante en los países tropicales, que se transmite a los humanos mediante la picadura de un mosquito. Se conocen cuatro serotipos (DENV-1, DENV-2, DENV-3 y DENV-4) y, de cada uno de ellos, varios genotipos con base en la divergencia de secuencias de ciertas regiones del genoma (1). Gonçalves, *et al.*, (2) clasificaron las cepas del DENV-1 en cinco genotipos (I-V), comparando la secuencia completa del gen *E*; las de los países de Latinoamérica, oeste del África y algunas regiones de Asia, son del genotipo V.

Se estima que anualmente ocurren 50 millones de infecciones por el DENV alrededor del mundo; en Latinoamérica, el número de casos graves se incrementó de 13.398 en los años 80 a 111.240 en el período 2000-2007 (3). La pandemia del dengue está generando gran carga económica para los servicios de salud en cada país; el gasto promedio anual se ha estimado en US\$2,0 billones, sin contar los costos por incapacidades laborales y ausencias escolares, que superan los 72.000 años de vida (4).

Se sabe que múltiples factores relacionados con la infestación del mosquito, el huésped, el virus y la asistencia médica, determinan la presentación de epidemias y muertes por dengue. La frecuente movilidad de la población entre áreas endémicas ha facilitado la dispersión del virus, llevando a la circulación simultánea de los cuatro serotipos en una misma localidad. Existe suficiente información que demuestra la coincidencia entre el cambio del serotipo predominante y el cambio en la incidencia del dengue, en áreas hiperendémicas de Latinoamérica y Asia (1,5-7). También, se ha reportado incremento en la incidencia que coincide con la introducción de un genotipo distinto y con la diversificación genética del genotipo presente, la cual puede llevar a extinción, reemplazo y circulación simultánea de linajes (8-12).

Colombia ocupa uno de los primeros lugares en la lista de países de Suramérica con mayor reporte de casos (3). En la última epidemia (2010), hubo, al menos, 157.152 casos y 217 muertes (13). Los costos por atención médica durante las epidemias

se han estimado en US\$25,9 millones por atención ambulatoria y US\$56,3 millones por hospitalización (14). El departamento de Santander es una de las regiones con mayor endemia; en el cuadro 1 se presenta el número anual de casos en los últimos 13 años, reportado por los organismos estatales (Secretaría Departamental de Salud e Instituto Nacional de Salud). En este periodo hubo epidemias en 1998, 2001 y 2010; no obstante, la mayor proporción de casos graves se vio en el período 2005-2008, esto es, entre la segunda y la tercera epidemia. Al menos, 90 % de los casos en Santander ocurrieron en el área metropolitana, la cual comprende los municipios de Bucaramanga, Floridablanca, Girón y Piedecuesta (15-17).

La predominancia relativa de cada serotipo del DENV en Santander, fue investigada en estudios previos llevados a cabo entre 1998 y 2004 y, nuevamente, entre 2007 y 2009 (18,19). Los cuatro serotipos se aislaron con distinta frecuencia relativa, dependiendo del año. El DENV-1 fue predominante (10/18) entre los aislamientos de 1998-1999, en los cuatro años siguientes (2000-2004) fue el menos prevalente (3/109) y nuevamente predominó (17/20) en 2008 (figura 1). Hasta donde se sabe, no hay información publicada sobre la distribución temporal de los serotipos en el período 2009-2012.

No se encontró información documentada sobre la contribución del DENV a la epidemiología del dengue en Colombia. Se hizo una aproximación con el DENV-3 de Santander, usando datos oficiales de incidencia del dengue, y se concluyó que la reintroducción del serotipo coincidió con la epidemia del 2001 y con

Cuadro 1. Casos del dengue en el departamento de Santander en el período 1998-2011

| Año | Total | Graves* | |
|------|--------|---------|------|
| | | No. | % |
| 1998 | 23.826 | 881 | 3,7 |
| 1999 | 4.956 | 25 | 0,5 |
| 2000 | 1.525 | 130 | 8,5 |
| 2001 | 10.530 | 779 | 7,4 |
| 2002 | 10.356 | 523 | 5,1 |
| 2003 | 6.638 | 288 | 4,3 |
| 2004 | 1.669 | 50 | 2,9 |
| 2005 | 1.586 | 419 | 26,4 |
| 2006 | 2.341 | 496 | 21,2 |
| 2007 | 4.396 | 1.337 | 30,4 |
| 2008 | 3.426 | 931 | 27,1 |
| 2009 | 9.491 | 2816 | 29,6 |
| 2010 | 17.611 | 540 | 2,8 |
| 2011 | 635 | 54 | 8,5 |

Fuente: referencias 15-17; *: según la clasificación tradicional (dengue clásico y dengue hemorrágico).

Correspondencia:

Raquel Elvira Ocazonez-Jiménez, Centro de Investigaciones en Enfermedades Tropicales, sede Guatiguará, Universidad Industrial de Santander, Piedecuesta, Colombia.

Telefax: (577) 645 5693

relocaz@uis.edu.co

Recibido: 04/05/12; aceptado:30/08/12

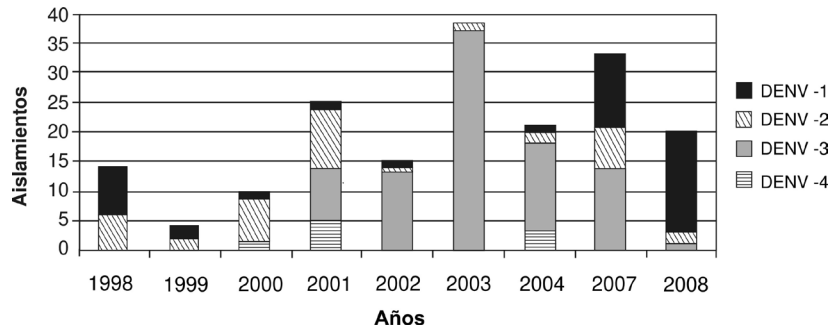


Figura 1. Predominancia temporal del DENV-1 con respecto a los otros serotipos en el departamento de Santander

mayor epidemia en los dos años siguientes. Además, los datos de seguimiento clínico sugirieron que la cepa introducida tiende más notoriamente a causar dengue leve que grave (18,19).

En este reporte se presenta la información del papel del DENV-1 en un período de 11 años. Llama la atención que el serotipo fue predominante en dos años distintos, durante los cuales la actividad del dengue, en términos de incidencia y gravedad, fue diferente. Se presentan aspectos de la filogenia y los hallazgos se relacionan con la predominancia temporal del virus y la incidencia del dengue grave.

Materiales y métodos

Incidencia del dengue

Se utilizaron los datos de los períodos 1998-2004 y 2007-2008, presentados en el cuadro 1. Esta información corresponde al número anual de casos y la proporción de graves, que fueron reportados por la Secretaría de Salud del Departamento de Santander (15,16) y el Ministerio de Salud (17).

Vigilancia del DENV en Ocaña, Norte de Santander

Se incluye esta actividad en consideración a que, en 2005-2006, no fue posible hacer la vigilancia de los serotipos en Santander, y Ocaña es un municipio ubicado a 290 km, aproximadamente, del área metropolitana en la ruta Cúcuta-Bucaramanga. Esta ruta geográfica se ha propuesto como puerta de entrada de virus provenientes de Venezuela a Santander (20). Entre abril de 2005 y noviembre del 2006, se recolectó suero de 685 casos febriles en el hospital local del municipio para un estudio de fiebre amarilla (21). Estos sueros se procesaron para aislamiento del DENV, siguiendo el protocolo descrito en estudios previos (18,19): brevemente, se adicionó suero diluido a células de mosquito *Aedes albopictus* (clon C6/36) y, después de siete días de incubación a 32 °C, las células se procesaron para confirmar la presencia del virus

mediante inmunofluorescencia. El serotipo del virus aislado se identificó por RT-PCR (reacción en cadena de la polimerasa de la transcriptasa inversa), usando los oligonucleótidos de Lanciotti.

DENV-1

Doce cepas de Santander fueron seleccionadas de la Colección del Laboratorio de Arbovirus del Centro de Investigaciones en Enfermedades Tropicales (CINTROP, Universidad Industrial de Santander). Los virus se aislaron en células C6/36 y el serotipo se identificó por inmunofluorescencia con anticuerpos monoclonales o RT-PCR (18,19). Para la selección de las cepas se tuvo en cuenta el año de aislamiento, de forma que se incluyeron aislamientos de períodos de alta predominancia del serotipo (1988 y 2007-2008) y baja predominancia (2001-2004). Cada cepa viral fue replicada en células C6/36, máximo dos veces.

Amplificación y secuenciación del gen E

Se escogió la secuencia completa del gen E (1.485 nucleótidos), en consideración a que es muy conservada y, por lo mismo, se ha usado con preferencia para estudiar la relación filogenética de cepas virales aisladas alrededor del mundo (1). Cada secuencia se amplificó por RT-PCR, siguiendo el protocolo usado en un estudio previo (20) con algunas modificaciones.

Brevemente, se extrajo el ARN viral del sobrenadante de los cultivos celulares infectados, usando el estuche comercial QIAamp viral RNA Mini Kit™ (QIAGEN, Inc., Valencia, CA), de acuerdo con el protocolo sugerido por el fabricante. Después, se obtuvo ADN por transcripción inversa, usando la enzima SuperScript III (Invitrogen) y oligonucleótidos aleatorios. El gen E se amplificó usando polimerasa GoTaq Green Master Mix™ (Promega, Madison, WI, USA) y los siguientes oligonucleótidos diseñados por los autores: D1-Fwd1-E:CCAGATGACGTTGACTGCTGGTG; D1-Rev1-E:CGCAGTGTGCATTGCTCCTTC; D1-Fwd2-

E:GGAACAGACAAGATTTGCTGGT;D1-Rev2:GCTTTTCCCCAGCTTTTCCA.

La amplificación del gen *E* se hizo en dos fragmentos superpuestos y el tamaño de los productos se confirmó por electroforesis en gel de agarosa. Los fragmentos se confirmaron con Hyperladder II Marker™ (Bioline) y los productos fueron purificados por columna, usando el estuche Wizard PCR Preps™ (Promega). La secuencia de nucleótidos de cada gen *E* fue obtenida por la compañía MacroGen DNA Sequencing Service (9700 Seneca Highway, Rockville, MD, 20850 USA). Para este servicio comercial, se remitieron el ADN en las condiciones exigidas por la compañía y los siguientes oligo-

nucleótidos diseñados por los autores: D1-MA-E: GGAGCTTGAGGTGTTATGGT y D1-MB-E: AGTTCTCTGCCCTTCCAGTT.

Análisis filogenético

La información de los virus seleccionados para el análisis se presenta en el cuadro 2. Las secuencias de ADN obtenidas fueron ensambladas y analizadas para confirmar su identidad, usando los programas Lasergene 9.0 (DNASTART) y BLAST, respectivamente, y se alinearon entre sí siguiendo el algoritmo de alineamiento múltiple implementado en MUSCLE (22).

El modelo óptimo de sustitución nucleotídica se obtuvo con base en el criterio de información de

Cuadro 2. DENV-1 incluidos en el análisis filogenético de este estudio

| Identificador | País | Año | Secuencia del gen E* |
|---------------|---------------------|------|----------------------|
| COSAN10898 | Colombia, Santander | 1998 | JQ581648.1 |
| COSAN224B98 | Colombia, Santander | 1998 | JQ581649.1 |
| COSAN03399 | Colombia, Santander | 1999 | JQ581650.1 |
| COSAN15401 | Colombia, Santander | 2001 | JQ581651.1 |
| COSAN02002 | Colombia, Santander | 2002 | JQ581652.1 |
| COSANLV27204 | Colombia, Santander | 2004 | JQ581632.1 |
| COSAN42807 | Colombia, Santander | 2007 | JQ581605.1 |
| COSAN22107 | Colombia, Santander | 2007 | JQ581618.1 |
| COSAN31207 | Colombia, Santander | 2007 | JQ581617.1 |
| COSAN37007 | Colombia, Santander | 2007 | JQ581626.1 |
| COSAN00708 | Colombia, Santander | 2008 | JQ581625.1 |
| COSAN07508 | Colombia, Santander | 2008 | JQ581628.1 |
| VE2004 | Venezuela | 2004 | FJ744701.1 |
| VE1995 | Venezuela | 1995 | AF425632.1 |
| VE2006 | Venezuela | 2006 | FJ639818.1 |
| VE2007 | Venezuela | 2007 | FJ850100.1 |
| VE1998 | Venezuela | 1998 | GU056033.1 |
| BR2008 | Brasil | 2008 | GU131863.1 |
| BR1990 | Brasil | 1990 | AF226685.2 |
| PY2000 | Paraguay | 2000 | AF514883.2 |
| PE1991 | Perú | 1991 | AF425626.1 |
| ARxxx | Argentina | - | AY277658.1 |
| CB1977 | Caribe | 1977 | D00501.1 |
| PR1995 | Puerto Rico | 1995 | FJ205875.1 |
| MX2006 | México | 2006 | HM171566.1 |
| MX1980 | México | 1980 | AF425623.1 |
| NI2005 | Nicaragua | 2005 | FJ024485.1 |
| CR1993 | Costa Rica | 1993 | AY153756.1 |
| SG2007 | Singapur | 2007 | JN022604.1 |
| JPxxx | Japón | - | AB074760.1 |
| LA1996 | Laos | 1996 | AB003090.1 |
| TT1986 | Trinidad y Tobago | 1986 | AF425639.1 |
| AU1983 | Australia | 1983 | AF425612.1 |
| HW1944 | Hawai | 1944 | EU848545.1 |
| TH1990 | Tailandia | 1990 | AY732442.1 |
| PF2005 | Polinesia Francesa | 2005 | DQ672557.1 |
| TH1963 | Tailandia | 1963 | AF425629.1 |
| MY1972 | Malasia | 1972 | EF457905.1 |

*: código de acceso al *GenBank*

Akaike (23), empleando el programa jModeltest™, versión 0.1.1 (24).

Para construir el árbol filogenético, se seleccionaron 26 secuencias de DENV-1 que representan diferentes localidades alrededor del mundo, disponibles en el banco de genes (*GenBank*). Las relaciones filogenéticas se reconstruyeron bajo el criterio de máxima verosimilitud, la estrategia implementada fue SPR + NNIs y el árbol de inicio se calculó con BIONJ (25) en PhyML™, versión 3.0 (26). La asignación de valores de confianza en los nodos se basó en un análisis *bootstrap* con 1.000 réplicas de la secuencia en RAxML (27).

Resultados

El DENV se aisló de 84 sueros de los casos febriles del municipio de Ocaña y se detectaron los cuatro serotipos. En la figura 2 se muestra la predominancia relativa de cada serotipo. El DENV-1 fue el menos prevalente en 2005, cuando correspondió al 2,5 % de los aislamientos (1/39), pero en 2006, su predominancia se incrementó a 44,4 % (8/18) en el tercer trimestre y a 59,2 % (16/27) en el cuarto. En contraste, en 2005 el DENV-2 fue el prevalente (31/39; 79,4 %), mientras que el DENV-3 (5/39; 12,8 %) y el DENV-4 (2/39; 5,1 %) fueron silentes; en 2006, el DENV-3 fue el prevalente en el primer semestre (6/11; 54,5 %), y el DENV-2 (9/45; 20,4 %) y el DENV-4 (1/45; 2,2 %), disminuyeron.

Se obtuvo la secuencia completa del gen *E* de las 12 cepas del DENV-1 de Santander, las cuales se compararon con las del mismo gen de 26 DENV-1 de otros países del período 1963-2008. El total de datos para análisis fueron 38 secuencias, de 1.485 nucleótidos cada una. El modelo sugerido por el análisis es GTR + gamma + invariante. El árbol filogenético obtenido al comparar las secuencias se presenta en la figura 3.

El análisis permitió agrupar las cepas del DENV-1 en los cinco genotipos obtenidos por Gonçalves (2): genotipo I (Hawai), genotipo II (Tailandia), genotipo III (Malasia), genotipo IV (Australia/

Pacífico Sur) y genotipo V (América/África). Las cepas de Santander se agruparon en el genotipo V, junto a las de países fronterizos (Venezuela, Brasil, Perú), otros de Suramérica (Argentina y Paraguay) y países de Centroamérica (México, Nicaragua, Puerto Rico y Costa Rica). La topología del árbol muestra que los virus colombianos se diversificaron en cuatro linajes temporalmente distintos: linaje 1 (L1), las cepas de 1998; linaje 2 (L2), las de 1999, 2001 y 2002; linaje 3 (L3), las de 2004, 2007 y 2008; y linaje 4 (L4), la cepa COSAN42807 aislada en 2007.

En la figura 4 se muestra la coincidencia entre diversificación genética y cambios en la predominancia del DENV-1 relativa a los otros serotipos. Las cepas L1 fueron abundantes en 1998 y fueron reemplazadas en 1999 por las L2, un evento que coincidió con incremento de la predominancia del DENV-2 (1999-2001); después, las L2 fueron reemplazadas por las L3 y esto coincidió con el período de mayor predominancia del DENV-3 (2003-2004). Las cepas L3 y la cepa L4 fueron abundantes durante el segundo período de dominancia del DENV-1, esto es, 2007-2008.

Como se encontró en estudios previos (17,18) y se muestra en el cuadro 1 y la figura 1, los dos períodos de predominancia del DENV-1 en Santander coincidieron con eventos distintos de actividad del dengue: el primero (1998-1999), con la epidemia de 1998 con pocos casos graves y, el segundo (2007-2008), con leve incremento (dos veces) del total de casos, pero mayor frecuencia de graves. En la figura 4 se muestra la coincidencia entre abundancia de linajes del DENV-1 y proporción anual de casos graves. Las cepas L1 fueron abundantes durante la epidemia de 1998, cuando la proporción de graves fue 3,7 %; mientras que las cepas L3/L4 lo fueron en 2007-2008, un periodo no epidémico cuando la proporción de graves fue 29 %. El análisis genético permitió concluir que L3/L4 constituye un grupo independiente de L1 según la distancia que muestra la topología del árbol (figura 3).

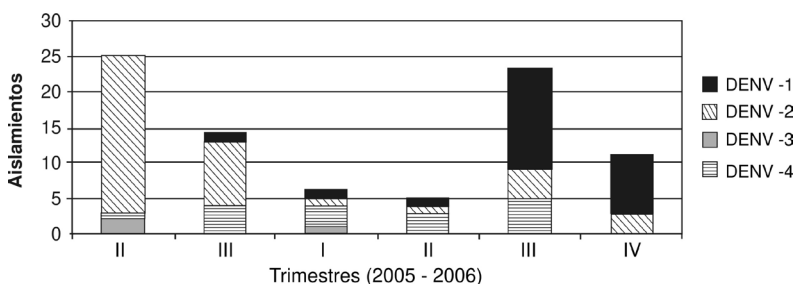


Figura 2. Predominancia temporal del DENV-1 con respecto a los otros serotipos, Ocaña, Norte de Santander, abril del 2005 y noviembre del 2006

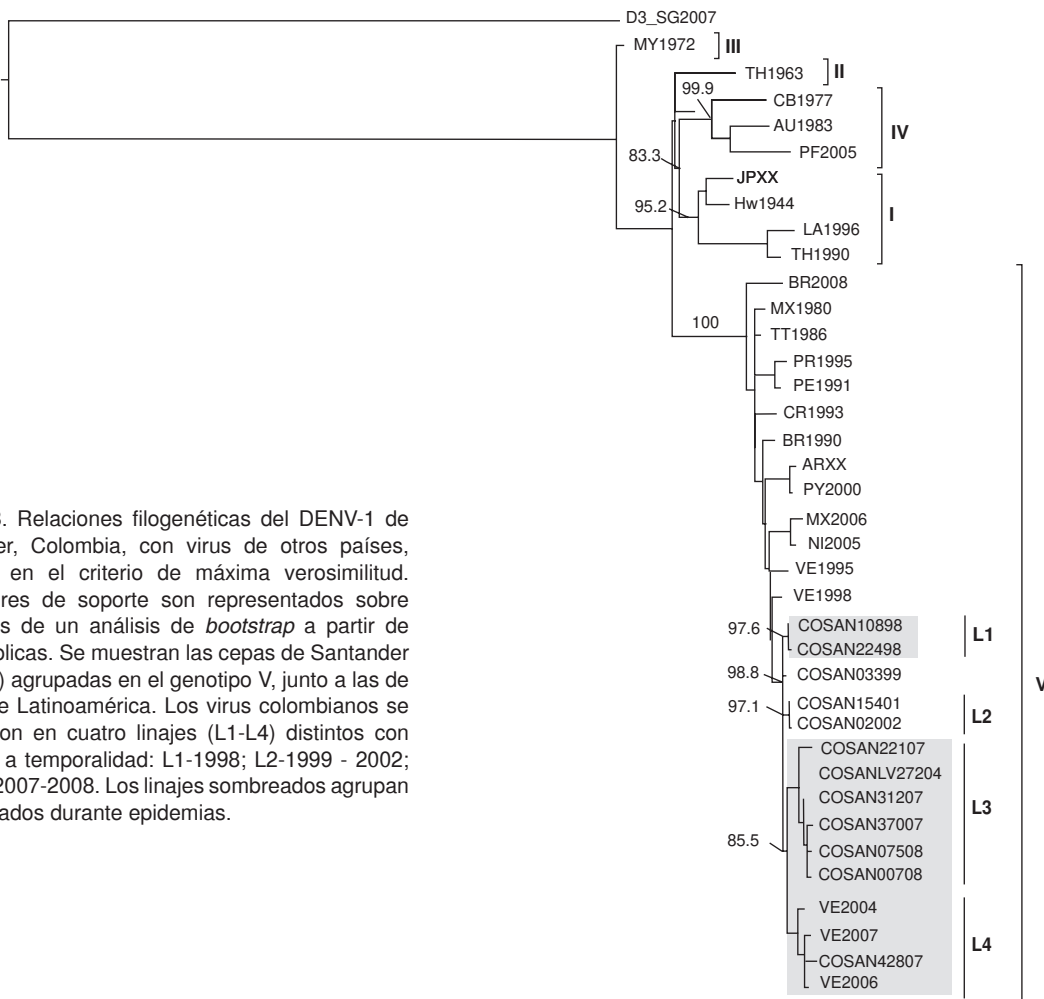
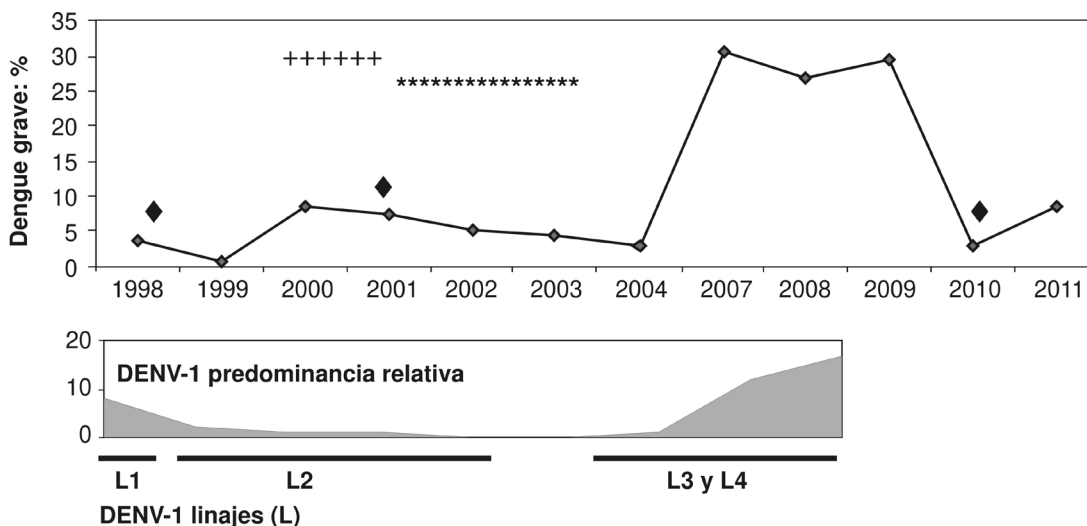


Figura 3. Relaciones filogenéticas del DENV-1 de Santander, Colombia, con virus de otros países, basadas en el criterio de máxima verosimilitud. Los valores de soporte son representados sobre los nodos de un análisis de *bootstrap* a partir de 1.000 réplicas. Se muestran las cepas de Santander (COSAN) agrupadas en el genotipo V, junto a las de países de Latinoamérica. Los virus colombianos se segregaron en cuatro linajes (L1-L4) distintos con respecto a temporalidad: L1-1998; L2-1999 - 2002; L3 y L4: 2007-2008. Los linajes sombreados agrupan virus aislados durante epidemias.



+ : predominancia del DENV-2; * : predominancia del DENV-3; ♦ : años cuando ocurrieron epidemias. Los datos se presentan en el cuadro 1, y las figuras 1 y 3.

Figura 4. Relación entre frecuencia de casos de dengue grave y predominancia relativa del DENV-1 en el departamento de Santander. Se muestra la coincidencia entre cambio de predominancia, diversificación genética del virus y proporción de casos graves, reportada por la Secretaría de Salud de Santander y el Instituto Nacional de Salud.

Discusión

El propósito de este estudio fue analizar el papel del DENV-1 en el comportamiento del dengue en el departamento de Santander, durante un período de 11 años, comprendido entre 1998 y 2008. En consideración a que la presentación del dengue es multifactorial, no se pretendió establecer relaciones causales, pero sí mostrar la coincidencia con aspectos de la genética del virus y su relación con los otros serotipos. Dado que en este estudio no se analizaron sueros de 2005 y 2006, se desconoce la predominancia relativa de los serotipos en esos años. No obstante, se podría presumir que en 2005 se incrementó la prevalencia del DENV-2 y en 2006 la del DENV-1, teniendo en cuenta que entre 2004 y 2007 el número de aislamientos se incrementó 3,5 y 12 veces, respectivamente. En Ocaña, el DENV-2 fue el serotipo prevalente en 2005 y, el DENV-1, en 2006 (figura 2).

Del análisis filogenético se concluye que las cepas DENV-1 de Santander son de genotipo V y este resultado también se encontró con otras 33 del área metropolitana y 10 cepas de Ocaña que están siendo analizadas. El mismo genotipo lo reportaron Méndez, *et al.*, (28) en virus de Santander de 1997 y de otros departamentos de Colombia. Estos autores reportaron además el genotipo I en una cepa del Valle del Cauca de 1983. El genotipo I no se ha detectado en la población viral (57 cepas) de Santander y Ocaña del período 1998-2008 analizada hasta la fecha.

La interacción del DENV-1 con los otros serotipos puede inferirse de las figuras 1 y 2. En Santander, en el intervalo entre los años de predominancia del serotipo (1998 y 2008), el DENV-2 se hizo prevalente en 2001 y luego el DENV-3, en 2002-2004. En ese contexto, la interacción entre los tres serotipos tendría la secuencia 1/2/3/1 con el DENV-1 predominando cada 9 a 10 años. En Ocaña, a pesar de solo 19 meses de vigilancia, se observa la secuencia 2/3/1. Esta misma relación en fase de los tres serotipos y en el intervalo de tiempo como en Santander se ha observado en Vietnam del Sur (29), Tailandia (6-31) Puerto Rico (5) y Nicaragua (7). Por otra parte, ambos períodos de predominancia del DENV-1 en Santander coincidieron con ausencia de aislamientos del DENV-4 y viceversa y lo mismo se observó en Ocaña. Esta interacción fuera de fase con el DENV-4 se ha observado también en Tailandia (30).

Los factores que contribuyeron al cambio de predominancia del DENV-1 en Santander pueden

ser varios. Los datos de este estudio sugieren que la diversificación genética del virus podría haber contribuido, ya que el reemplazo de linaje coincidió con la disminución o incremento de la abundancia del virus. El cambio en la predominancia de serotipo coincidiendo con cambio de linaje, se ha visto en Tailandia (10), India (11) y Puerto Rico (5). Por otra parte, la diversificación genética del DENV-1 coincidió con incremento de la prevalencia del DENV-2 y DENV-3 (figura 4). Se presume que la mayor abundancia de estos dos serotipos incrementó la carga inmunitaria de la población contra los mismos, la cual incluye anticuerpos que reaccionan cruzadamente con el DENV-1. Los resultados de varios estudios sugieren que la inmunidad cruzada es un factor determinante de la diversificación genética del virus, que afecta su predominancia (5,8-11,29,30).

Dado que la epidemiología del dengue es multifactorial y que el registro de casos mediante un sistema de vigilancia pasiva es impreciso, no es posible concluir sobre el papel del DENV-1 en la incidencia del dengue grave en Santander. No obstante, dos aspectos merecen ser considerados. El primero es que la diversificación genética del virus pudo haber generado cepas más virulentas que circularon en 2007-2008. El DENV-1 se aisló en nuestro laboratorio de una mujer que murió en un lapso de cinco días en 2008, y también, en el Instituto Nacional de Salud (Bogotá) de casos fatales ocurridos en 2010 (Liliana Abello. Comportamiento actual del dengue en Colombia. Ponencia en el Curso Internacional de Intervención Integral del Dengue, Bucaramanga, 9-14 de julio de 2012). El segundo aspecto es que el incremento del dengue grave en otros países se ha relacionado con cambio de linaje del genotipo circulante (9,11,12,31). Los períodos de predominancia del DENV-1 incrementan la proporción de individuos con infección primaria por el serotipo, los cuales pueden sufrir una secundaria infección por otro. La infección secuencial DENV-1/DENV-2 se demostró en 98 % de los casos con dengue grave en la epidemia cubana de 1981 (32) y la secuencia DENV-1/DENV-3 se ha asociado con mayor gravedad del dengue (33,34).

Los datos presentados en este reporte muestran la necesidad de desarrollar estudios bien conducidos para profundizar en el conocimiento de la relación entre la dinámica de circulación de los serotipos y el patrón epidemiológico del dengue en Colombia. Por otra parte, muestra la necesidad de desarrollar

la vigilancia virológica de manera ininterrumpida en cada área endémica, que incluya, además de la identificación de los serotipos, estudios biogeográficos y filogenéticos para vigilar la entrada de nuevos genotipos, rutas de dispersión del virus dentro del país y el resurgimiento de cepas con mayor potencial de transmisión.

Agradecimientos

Los autores agradecen a los médicos y bacteriólogas del Hospital Emiro Quintero Cañizares y a María Victoria Bermonth, coordinadora de Epidemiología, Instituto Departamental de Salud Pública, Norte de Santander, por el apoyo recibido para el estudio en Ocaña.

Conflicto de intereses

Los autores manifiestan que en el manuscrito presentado no se presentan conflictos de interés.

Financiación

Este estudio fue financiado por Colciencias-Universidad Industrial de Santander, proyecto N° 1102-04-16376, y proyecto UIS-5658.

Referencias

- Weaver S, Vasilakis N.** Molecular evolution of dengue viruses: Contributions of phylogenetics to understanding the history and epidemiology of the preeminent arboviral disease. *Infect Gen Evol.* 2009;9:523-40. <http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2009.02.003>
- Goncalvez AP, Escalante AA, Pujol FH, Ludert JE, Tovar D, Salas RA, et al.** Diversity and evolution of the envelope gene of dengue virus type 1. *Virology.* 2002;303:110-9. <http://dx.doi.org/10.1006/viro.2002.1686>
- San Martín JL, Brathwaite O, Zambrano B, Solórzano J, Bouckennooghe A, Dayan GH, et al.** The epidemiology of dengue in the Americas over the last three decades: A worrisome reality. *Am J Trop Med Hyg.* 2010;82:128-35. <http://dx.doi.org/10.4269/ajtmh.2010.09-0346>
- Shepard D, Coudeville L, Halasa YA, Zambrano B, Dayan GH.** Economic impact of dengue illness in the Americas. *Am J Trop Med Hyg.* 2011;84:200-7. <http://dx.doi.org/10.4269/ajtmh.2011.10-0503>
- McElroy KL, Santiago GA.** Endurance, refuge, and reemergence of dengue virus type 2, Puerto Rico, 1986-2007. *Emerg Infect Dis.* 2011;17:64-71. <http://dx.doi.org/10.3201/eid1701.100961>
- Fried JR, Gibbons RV, Kalayanarooj S.** Serotype-specific differences in the risk of dengue hemorrhagic fever: An analysis of data collected in Bangkok, Thailand from 1994 to 2006. *PLoS Negl Trop Dis.* 2010;4:617. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0000617>
- Harris E, Videá E, Pérez L, Sandoval E, Téllez Y, Pérez M, et al.** Clinical, epidemiologic, and virologic features of dengue in the 1998 epidemic in Nicaragua. *Am J Trop Med Hyg.* 2000;63:5-11.
- Lourenço J, Recker M.** Viral and epidemiological determinants of the invasion dynamics of novel dengue genotype. *Plos Neg Trop Dis.* 2010;4:e894. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0000894>
- Imrie A, Zhao Z, Bennett SN, Kitsutani P, Laille M, Effler P.** Molecular epidemiology of dengue in the Pacific: Introduction of two distinct strains of dengue virus type-1 into Hawaii. *Ann Trop Med Parasitol.* 2006;100:327-36. <http://dx.doi.org/10.1179/136485906X105589>
- Zhang C, Mammen MP Jr, Chinnawirotpisan P, Klungthong C, Rodpradit P, Monkongdee P, et al.** Clade replacements in dengue virus serotype 1 and 3 are associated with changing serotype prevalence. *J Virol.* 2005;79:15123-30. <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.79.24.15123-15130.2005>
- Kukreti H, Chaudhary A, Rautela RS, Anand R, Mittal V, Chhabra M, et al.** Emergence of an independent lineage of dengue virus type 1 (DENV-1) and its co-circulation with predominant DENV-3 during the 2006 dengue fever outbreak in Delhi. *Int J Infect Dis.* 2008;12:542-9. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijid.2008.02.009>
- Dash P, Parida M, Saxena P.** Reemergence of dengue virus type-3 (subtype III) in India: Implications for increased incidence of DHF & DSS. *Virology.* 2006;3:55-65. <http://dx.doi.org/10.1186/1743-422X-3-55>
- Méndez JA.** Situación epidemiológica del dengue en Colombia. Fecha de consulta: 6 de septiembre de 2011. Disponible en: <http://www.google.es/Dengue+serotipos+Colombia>
- Alvis N.** Impacto económico del dengue en Colombia. *Infectio.* 2008;12(Supl.1):7-20.
- Álvarez A, Martínez H, Millán S, López L.** Diagnóstico de la situación de salud en Santander. Segunda edición. Bucaramanga: Secretaría de Salud de Santander; 2004. p. 56.
- García A, Gutiérrez M, Ramírez AN, Mantilla ME.** Instituto Nacional de Salud. Estrategia de gestión integrada (EGI) para la prevención y control del dengue en Santander. Colombia 2006-2010. *Revista del Observatorio de Salud Pública de Santander.* 2007;2:31-9.
- Ministerio de Salud y de la Protección Social.** Instituto Nacional de Salud. Vigilancia virológica del dengue en Colombia 2011. Fecha de consulta: 6 de diciembre de 2011. Disponible en: <http://www.ins.gov.co/pdf-investiga/v-dengue>.
- Ocazonez RE, Cortés FM, Villar LA, Gómez SY.** Temporal distribution of dengue virus serotypes in Colombian endemic area and dengue incidence. Re-introduction of dengue-3 associated to mild febrile illness and primary infection. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2006;101:725-31. <http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02762006000700004>
- Gómez S, Villabona-Arenas C, Torres FA, Miranda-Esquivel D, Ocazonez RE.** Dengue virus serotype-3 (genotype III) from Colombia: Perspective of its pathogenic potential. *Dengue Bulletin.* 2008;32:126-37.
- Villabona-Arenas CJ, Miranda-Esquivel DR, Jiménez RE.** Phylogeny of dengue virus type 3 circulating in Colombia between 2001 and 2007. *Trop Med Int Health.* 2009;14:1241-50. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-3156.2009.02339.x>
- Gómez SY, Ocazonez RE.** Anticuerpos neutralizantes contra el virus de la fiebre amarilla 17 D en colombianos

- vacunados y no vacunados con inmunidad a dengue. *Rev Salud Pública*. 2008;10:796-807. <http://dx.doi.org/10.1590/S0124-00642008000500012>
22. **Edgar RC**. MUSCLE: Multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res*. 2004;32:1792-7. <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkh340>
 23. **Akaike H**. A new look at the statistical model identification. *IEEE Trans Automat Contr*. 1974;19:716-23. <http://dx.doi.org/10.1109/TAC.1974.1100705>
 24. **Posada D, Crandall KA**. Selecting the best-fit model of nucleotide substitution. *Syst Biol*. 2001;50:580-601. <http://dx.doi.org/10.1080/10635150118469>
 25. **Gascuel O**. BIONJ: An improved version of the NJ algorithm based on a simple model of sequence data. *Mol Biol Evol*. 1997;14:685-95.
 26. **Guindon S, Gascuel O**. A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Syst Biol*. 2003;52:696-704. <http://dx.doi.org/10.1080/10635150390235520>
 27. **Stamatakis A**. RAxML-VI-HPC: Maximum likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models. *Bioinformatics*. 2006;22:2688-90. <http://dx.doi.org/10.1093/bioinformatics/btl446>
 28. **Méndez J, Usme-Ciro JA, Domingo C, Rey GJ, Sánchez JA, Tenorio A, et al**. Phylogenetic history demonstrates two different lineages of dengue type 1 virus in Colombia. *Virology*. 2010;7:226. <http://dx.doi.org/10.1186/1743-422X-7-226>
 29. **Recker M, Blyuss K, Simmons P, Tinh Hien T, Wills B, Farrar J, et al**. Immunological serotype interactions and their effect on the epidemiological pattern of dengue. *Proc Biol Sci*. 2009;276:2541-8. <http://dx.doi.org/10.1098/rspb.2009.0331>
 30. **Adams B, Holmes E, Zhang C, Mammen M, Nimmannitya S, Kalayanaroj S, et al**. Cross-protective immunity can account for the alternating epidemic pattern of dengue virus serotypes circulating in Bangkok. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103:14234-9. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0602768103>
 31. **Nisalak A, Endy TP, Nimmannitya S, Kalayanaroj S, Thisyakorn U, Scott RM, et al**. Serotype-specific dengue virus circulation and dengue disease in Bangkok, Thailand from 1973 to 1999. *Am J Trop Med Hyg*. 2003;68:191-202.
 32. **Guzmán M, Kouri G, Valdés L, Bravo J, Vásquez S, Halstead SB**. Enhanced severity of secondary dengue 2 infections occurring at an interval of 20 compared with 4 years after dengue 1 infection. *PAHO J Epidemiol*. 2002;81:223-7.
 33. **Álvarez M, Rodríguez-Roche R, Bernardo L, Vázquez S, Morier L, Gonzalez D, et al**. Dengue hemorrhagic fever caused by sequential dengue 1-3 virus infections over a long time interval: Havana epidemic, 2001-2002. *Am J Trop Med Hyg*. 2006;75:1113-7.
 34. **Graham RR, Juffrie M, Tan R, Hayes CG, Laksono I, Ma'roef C, et al**. A prospective seroepidemiologic study on dengue in children four to nine years of age in Yogyakarta, Indonesia. I. Studies in 1995-1996. *Am J Trop Med Hyg*. 1999;61:412-9.