

Original

Caracterización molecular del virus dengue aislados en pacientes con diferentes manifestaciones clínicas. Paraguay, 2007

Vázquez C¹, Coluchi N¹, Stella V¹, Probst C¹, Candia C¹, Duarte dos Santos C¹¹ Departamento de Virología. Laboratorio Central de Salud Pública. Ministerio de Salud Pública y Bienestar Social.

RESUMEN

Paraguay registró epidemias de dengue por DEN1 en los años 1989 - 2000, y pequeños brotes por DEN2 y/o DEN3 en los siguientes años, sin reporte de FHD ni muertes por dengue hasta 2005. De 2006 a 2007, DEN3 provocó una epidemia con más de 28.000 casos, aparición de FHD, formas severas con manifestaciones atípicas y muertes por Dengue. Para caracterizar el genoma de virus DEN3 aislados de pacientes con diferentes perfiles clínicos y detectar posibles marcadores moleculares; determinamos la secuencia genómica completa de tres virus aislados de un caso fatal FHD, un caso Fiebre Dengue y un caso fatal de dengue primario con manifestaciones atípicas del año 2007 respectivamente. Adicionalmente, un aislado de caso FD de 2006 fue incluido. Comparadas con DEN3 (BR-03/290, DF) como referencia, mostraron correspondencia al Genotipo III similar a los DEN3 aislados anteriormente en Paraguay e identificamos 103 mutaciones nucleotídicas, 91 de ellas compartidas por todos los virus paraguayos siendo 15 no sinónimas. El aislado de caso atípico presentó una mutación no sinónima en la posición 1731 que corresponde a la proteína de Envoltura (E), en tanto que el aislado de caso FHD una mutación en la posición 7644 correspondiente a la proteína no estructural 5 (NS5). Los virus aislados en 2007 comparados con el aislado en 2006, no presentaron otras mutaciones no sinónimas. Mutaciones puntuales en la proteína E pueden estar asociadas con modificación en la virulencia, por tanto estudios estructurales y funcionales posteriores permitirán dilucidar las implicaciones de las mutaciones encontradas en este estudio.

Palabras claves: dengue, epidemia, serotipos, Paraguay

ABSTRACT

Burden of Influenza associated with hospitalizations and death in Paraguay, 2011-2015

Paraguay recorded epidemics of dengue due to DEN1 in the years 1989 - 2000, and small outbreaks due to DEN2 and / or DEN3 in the following years, without FHD reports or deaths due to dengue until 2005. From 2006 to 2007, DEN3 caused an epidemic with more of 28,000 cases, appearance of FHD, severe forms with atypical manifestations and deaths from Dengue. To characterize the genome of DEN3 virus isolated from patients with different clinical profiles and detect possible molecular markers; We determined the complete genomic sequence of three viruses isolated from a fatal case FHD, a case Dengue Fever and a fatal case of primary dengue with atypical manifestations of the year 2007 respectively. Additionally, a 2006 FD case isolate was included. Compared to DEN3 (BR-03/290, DF) as a reference, they showed correspondence to Genotype III similar to the DEN3 previously isolated in Paraguay and we identified 103 nucleotide mutations, 91 of them shared by all the Paraguayan viruses being 15 not synonymous. The atypical case isolate presented a non-synonymous mutation at position 1731 that corresponds to the envelope protein (E), while the FHD case isolate a mutation at position 7644 corresponding to non-structural protein 5 (NS5). The viruses isolated in 2007 compared to the virus isolated in 2006, did not show other non-synonymous mutations. Point mutations in protein E may be associated with virulence modification, therefore subsequent structural and functional studies will elucidate the implications of the mutations found in this study.

Keywords: dengue, epidemic, serotypes, Paraguay

Autor para correspondencia:

Dra. Cynthia Vázquez. Laboratorio Central de Salud Pública y Bienestar Social. Asunción
Correo electrónico: cynthiavlm@yahoo.com

INTRODUCCIÓN

El dengue, que está considerado la arbovirosis más importante en países tropicales, es causado por los 4 serotipos del virus dengue (DEN-1, -2, -3 y -4) y transmitida al hombre a través de la picadura de mosquitos. El dengue representa actualmente uno de los principales problemas de salud pública en el mundo y se estima que anualmente ocurren al menos 100 millones de infecciones por dengue en todo el mundo; entre los infectados, cerca de 550 mil necesitan hospitalización y unos 25 mil mueren de la enfermedad¹⁻⁴.

El espectro clínico de las infecciones por dengue, abarca desde la fiebre dengue (FD) autolimitada, hasta las formas más severas de la enfermedad como el dengue hemorrágico (FHD) y el síndrome de shock por dengue (SSD), las cuales, sin tratamiento adecuado pueden conducir a la muerte.⁴ Recientemente se han observado manifestaciones clínicas inusuales y complicaciones, caracterizadas por encefalopatías, hepatomegalia con falla hepática fulminante, disfunción sistólica, encefalomielite diseminada aguda y otras.⁵⁻⁹ La variación de la sintomatología del dengue puede estar ocasionada tanto por factores virales como inmunológicos.^{10,11} En numerosos estudios se ha observado, que infecciones secuenciales o secundarias por virus dengue, tienden a producir cuadros severos.¹²⁻¹⁶ Se han postulado otros factores relevantes en la patogénesis del FHD: virus de cepas específicas virulentas,¹⁷⁻¹⁹ predisposición genética a enfermedad severa en ciertas poblaciones;^{20, 21} y otros factores de riesgo como edad, sexo y estado nutricional.²²⁻²⁴ Aunque estas hipótesis no son totalmente exclusivas, y se cree que varias de ellas podrían estar involucradas en el desarrollo de formas severas de la enfermedad, recientes eventos sugieren la importancia de los factores virales, especialmente aquellos relacionados al DEN-3 genotipo III^{7, 25-28}.

Genéticamente, el dengue es un virus de ARN positivo de simple cadena con aproximadamente 11kb de longitud. Su genoma contiene un marco de lectura abierto simple que codifica una poliproteína precursora, y es flanqueado por dos regiones no traducidas (5' y 3'NTR). Mediante modificaciones co y post traduccionales del precursor, se forman tres proteínas no estructurales, la nucleocápside (C), la envoltura (E) y la membrana (M); y 7 proteínas no estructurales NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b, y NS5.²⁸ Varios estudios enfocados en las bases moleculares de la patogénesis, han atribuido determinantes de virulencia a mutaciones en proteínas estructurales y no estructurales, así como en las regiones NTR del genoma

de los flavivirus^{19, 30-32, 50}.

Luego de dos grandes epidemias debidas al DEN-1 en los años 1989 y 2000; y de un pequeño brote de DEN-2 en el 2001,^{33, 34} el DEN-3 fue introducido por primera vez en Paraguay en el año 2002, proveniente de Rio de Janeiro Brasil.^{35, 36} En los años 2003 y 2004 fue también confirmada la circulación de DEN-3 en el país, durante brotes de mediana magnitud. Todos los cuadros clínicos reportados hasta entonces correspondieron a FD sin casos fatales. Más recientemente, durante prácticamente todo el año 2006 fueron notificados casos de dengue, siendo aislado exclusivamente el serotipo 3, sin ningún caso de FHD/SSD. A partir de enero del 2007, hubo un aumento considerable en el número de casos, con una epidemia explosiva en la cual el DEN-3 era aún el único serotipo detectado. Sin embargo a diferencia de lo observado el año anterior, casos de DHF/DSS y muertes por dengue comenzaron a ser reportados. Además, análisis de anatomía patológica de algunos casos fatales, diagnosticados como dengue primario por pruebas laboratoriales, no reunían requisitos para un diagnóstico de FHD/SSD. Estos casos presentaron manifestaciones atípicas con miocarditis, neumonitis, hepatitis y afectación del sistema nervioso central en algunos; siendo la causa de muerte choque cardiogénico (Bellasai J. datos no publicados).

Dado que la diversidad genética del virus podría influir en la severidad de la patología, nuestro objetivo fue caracterizar el genoma de los virus dengue aislados durante la epidemia del 2007, en muestras de pacientes con diferentes perfiles clínicos y detectar potenciales marcadores moleculares de virulencia entre ellos

MATERIALES Y METODOS

Fueron utilizadas las definiciones de caso probable y confirmado propuestas por la Organización Mundial de la Salud para FD, FHD y SSD.¹ Para el estudio fueron seleccionadas muestras de 3 pacientes sin patologías de base, con manifestaciones clínicas bien diferenciadas, obtenidas durante la epidemia de dengue del año 2007 en Paraguay. Las muestras consistieron en: suero y macerado de bazo de un caso fatal con diagnóstico probable de FHD, suero de un caso fatal con diagnóstico probable de FD primario severo con manifestaciones atípicas y suero de un paciente con diagnóstico probable de FD típico. Se incluyó también suero de un paciente con FD confirmado en el 2006.

Metodología Serologica

MAC-ELISA: con protocolo del CDC de Puerto Rico^{37, 38}, utilizando una mezcla de los cuatro antígenos de Dengue producidos en el Laboratorio Central de Salud Pública de Paraguay y en el Instituto Evandro Chagas de Brasil, fue realizado para la detección de anticuerpos IgM contra dengue en las muestras de suero de pacientes con 5 o más días de evolución desde el inicio de síntomas.

ELISA IgG: fue realizado de acuerdo a recomendaciones del fabricante, mediante el kit comercial "Dengue Fever Virus IgG Dx Select" (Focus Diagnostics Cypress, CA, USA) para caracterizar la respuesta inmune de los pacientes como primaria o secundaria. Títulos menores a 100 en muestras agudas (menos de 5 días de evolución) y menores 2.560 en muestras convalecientes (≥ 5 días de evolución) fueron consideradas infecciones primarias. Títulos mayores o iguales a 100 en muestras agudas (menos de 5 días de evolución) y menores 2.560 en muestras convalecientes (≥ 5 días de evolución) fueron consideradas infecciones secundarias.

ELISA NS1: fue realizado para detectar proteína viral NS1 de virus dengue en muestras de todos los pacientes estudiados. Se utilizó el kit comercial "Platelia Dengue NS1 Ag (Bio-Rad Laboratories, Marnes-la-Coquette, France)" que consiste en un ELISA formato sandwich de un paso que utiliza anticuerpo monoclonal de ratón (MAb) para captura y revelación. Si el antígeno NS1 está presente en el suero, se forma un inmunocomplejo MAb-NS1-MAb/peroxidasa. Todos los procedimientos se realizaron de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

Aislamiento viral

La muestra de bazo recogida en Medio Esencial Mínimo (MEM) y las muestras de suero; fueron inoculados en células C6/36 de *Aedes albopictus* con MEM más 2% de suero fetal bovino.³⁹ Luego de 14 días de incubación a 28°C, se recogieron los sobrenadantes de las células infectadas, en los cuales se verificó el aislamiento por transcripción reversa y reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR).⁴⁰

Extracción de ARN viral: Las muestras originales y los sobrenadantes de cultivo fueron procesados para la extracción de ARN viral utilizando el kit comercial QiaAmp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN, Valencia, CA, USA) de acuerdo al protocolo del fabricante. El ARN obtenido fue almacenado a -80°C o inmediatamente sometido a RT-PCR.

RT-PCR: Para la detección y tipificación de virus den-

gue en muestras originales y sobrenadantes del primer pasaje en cultivo celular, fue realizada una RT-PCR en un solo paso de acuerdo al protocolo descrito por Eva Harris et al.⁴⁰.

Para la secuenciación genómica se sintetizó cDNA viral utilizando la técnica de Random primers, el cual se utilizó como templado para una PCR con 12 pares de oligonucleótidos diseñados en el Instituto de Biología Molecular de Paraná, Curitiba-Brasil, correspondientes a la totalidad del genoma viral. Los productos de la PCR fueron sometidos a electroforesis en gel de agarosa al 0,8% teñido con bromuro de etidio 0.4 µg/mL para la visualización de las bandas.

Purificación de Productos de PCR:

Los productos de PCR fueron purificados a partir del gel de agarosa mediante el kit comercial QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN, Valencia, CA, USA) de acuerdo al protocolo del fabricante.

Secuenciación: los fragmentos de cDNA amplificados por PCR y purificados, fueron directamente secuenciados en el secuenciador ABI 3100 utilizando el método BigDye Terminator (Applied Biosystems Inc, USA). Para secuenciar fueron seleccionados los primers requeridos para cubrir el genoma entero por superposiciones. Se utilizó el software Phred/Phrap/Consed system package (Ewing et al, 1998; Swing and Green, 1998; Gordon et al; 1998)⁴¹⁻⁴² para ensamblar los fragmentos en la secuencia más probable.

La predicción de la estructura secundaria se realizó según Zucker et al. 1999.⁴³

Las secuencias obtenidas fueron comparadas con una cepa de referencia de DEN-3 proveniente de un caso de FD de Río de Janeiro Brasil año 2003 (BR-03/290, DF).

RESULTADOS

La infección por virus dengue fue confirmada laboratorialmente en todos los pacientes estudiados. Se logró aislar virus DEN-3 (Fig 1) y se detectó proteína NS1 en todas las muestras analizadas. El MAC-ELISA resultó positivo en la muestra del caso de FHD que era la única con más de 5 días de evolución. En la misma muestra se obtuvieron títulos de IgG compatibles con dengue secundario, mientras que las demás presentaron títulos compatibles con dengue primario. **Tabla 1.**

Tabla 1. Resultados de Estudios laboratoriales para la confirmación del diagnóstico de dengue

Casos	Días de evolución	MAC - Elisa	Elisa IgG	Elisa NS1	RT-PCR
Caso de FHD	6	Positivo	>2560	Positivo	DEN-3
Caso de FD atípico	5	Negativo	<100	Positivo	DEN-3
Caso de FD 2007	2	NR*	<100	Positivo	DEN-3
Caso de FD 2006	2	NR*	<100	Positivo	DEN-3

* NR = No realizado

De acuerdo con lo observado en la figura 1, la líneas 1 y 11: marcador de peso molecular 100-pb; 2 y 12: control negativo; 3, 4, 5 y 6: sobrenadantes de aislados de bazo de caso de FHD, suero de caso de FD atípico, suero de caso de FD 2007 y suero de caso FD 2006; 7, 8 y 9: muestras de suero originales de caso de FHD, caso de FD atípico y caso de FD 2007; y 10: control positivo DEN-3

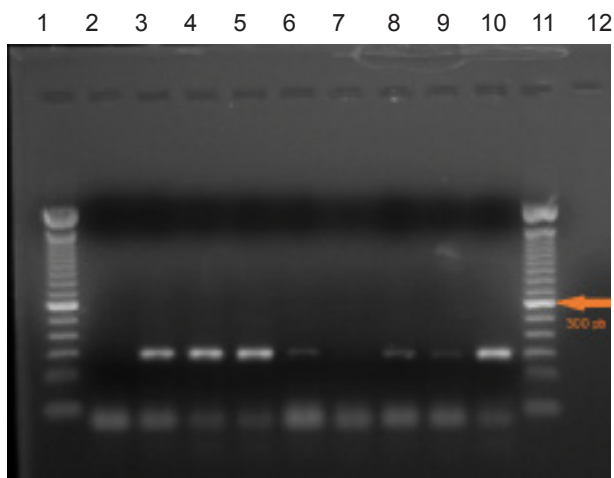


Figura 1. Detección de DEN-3 por RT-PCR

La estrategia utilizada con los 12 pares de oligonucleótidos, permitió la amplificación de productos de PCR correspondientes a la totalidad del genoma viral. Análisis de las secuencias obtenidas permitieron el alineamiento de las muestras estudiadas con la cepa de referencia del IBMP para DEN-3 (BR-03/290, DF). Al igual que la cepa de referencia, los virus analizados correspondieron al genotipo III.

En comparación a la cepa de referencia fueron identificadas 103 mutaciones nucleotídicas, 91 de las cuales son compartidas por todos los virus paraguayos, siendo 15 de ellas no sinónimas.

Al comparar 1470 nucleótidos de la secuencia codificadora de la proteína E entre BR-03/290, y las muestras de FD 2007 y FD atípico, fueron identificadas 20 mutaciones

en esa región (98,64% de similaridad con BR-03/290). Siendo que cuatro de ellas eran no sinónimas: 582N→K, 625H→Y, 640E→D e 751T→I. El análisis de mutaciones específicas de cada virus en comparación con BR-03/290 reveló que cada uno presentó solamente una única mutación propia (por lo tanto, difieren entre si en $2/1470 = 0,1\%$), y con relación a BR-03/290 en $21/1470 = 1,4\%$.

El virus aislado del cuadro atípico presenta en relación a los demás virus paraguayos una mutación no sinónima en la posición 1731 T→I que corresponde a la proteína E, en tanto que el aislado del caso de FHD presenta una mutación en la posición 7644 L→R correspondiente a la proteína no estructural 5 (NS5) con respecto a los demás virus.

Al comparar las regiones NTR, se observa que las 5'NTR de los virus estudiados son idénticas a BR-03/290, mientras que las 3'NTR de los 4 virus paraguayos presentan dos mutaciones con respecto a la cepa de referencia, pero idénticas entre ellos. Estas mutaciones provocan una variación en la estructura secundaria preliminar prevista para los virus paraguayos comparada con la cepa de referencia (Fig.2 y Fig. 3).

Además de las ya mencionadas, los virus aislados en el 2007 comparados con el aislado en 2006, no presentan otras mutaciones no sinónimas.

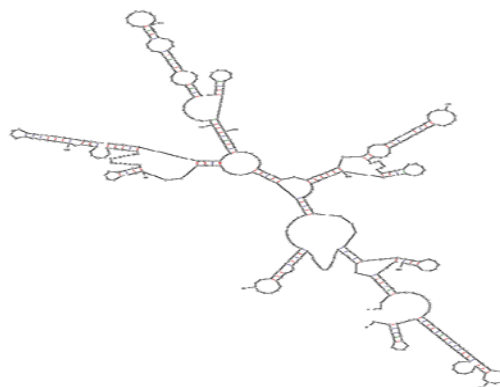


Figura 2. Estructura secundaria prevista para la 3' NTR de los 4 virus DEN-3 paraguayos

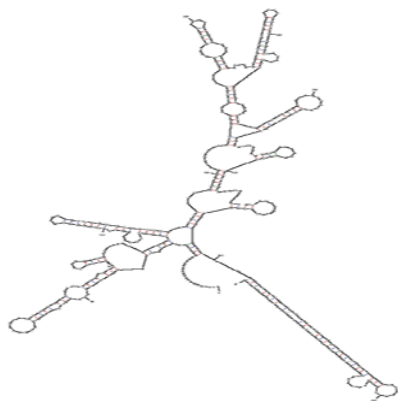


Figura 3. Estructura secundaria prevista para la 3' NTR de la cepa de DEN-3 (BR-03/290, DF)

DISCUSIÓN

La epidemia de dengue del año 2007 en Paraguay, puede considerarse la más severa que ha sufrido el país, en términos no solamente de números de casos reportados, sino también en cuanto a la severidad de las manifestaciones clínicas y el número de muertes confirmadas. Como ya se ha visto en otros países⁵⁻⁹, durante esta epidemia se observaron además de los casos de FHD/SSD, cuadros de dengue primario con manifestaciones inusuales caracterizadas por la incidencia de miocarditis, hepatitis, neumonitis y afectación del SNC, que en varios casos condujo a la muerte por choque cardiogénico según estudios de anatomía patológica (Bellasai J. datos no publicados). Como estas variaciones en la clínica pueden atribuirse a diversos factores, entre ellos características virales específicas¹⁷⁻¹⁹, presentamos aquí la caracterización genética de los virus dengue aislados durante la epidemia del 2007, en muestras de pacientes con diferentes perfiles clínicos.

El virus aislado en todos los casos estudiados fue el DEN-3 genotipo III, el cual fue también responsable de severas epidemias en otros lugares^{7, 25-28}. Sin embargo, este mismo genotipo ya fue detectado en Paraguay en años anteriores sin la ocurrencia de formas severas de la enfermedad³⁶, este hecho podría deberse a que aparentemente la virulencia aumenta a medida que el agente pasa por el huésped humano⁴⁴, lo que podría haber ocurrido en esta epidemia cuyo número de casos reportados fue mucho mayor que en brotes anteriores.

De los dos pacientes con cuadros severos y derivación fatal estudiados, solamente en el caso clasificado como dengue hemorrágico, se encontró respuesta de anticuerpos compatible con dengue secundario, lo que es consistente con la hipótesis de la amplificación mediada por anticuerpos en infecciones secuenciales¹²⁻¹⁶. Sin embargo en el

caso con manifestaciones atípicas, esta teoría no explica la severidad del cuadro clínico, ya que se encontraron títulos de anticuerpos compatibles con dengue primario.

Aunque el análisis de la secuencia del genoma de los 4 virus paraguayos estudiados demuestra que son bastante semejantes entre sí, el virus aislado del caso de FD con manifestaciones atípicas presentó una sustitución de aminoácido (T>I) a nivel de la proteína E con respecto a los virus aislados de casos con otros perfiles clínicos (FD y FHD). La glicoproteína E representa el antígeno viral dominante en la estimulación de anticuerpos neutralizantes y respuesta inmune protectora en el huésped, además es responsable de la adsorción del virus a la célula, de la fusión de membranas y del ensamblaje viral^{32, 45, 46}. Mutaciones en esta proteína demostraron tener dramáticos efectos en la virulencia de otros flavivirus in vitro o in vivo¹⁹. Recientemente han sido identificados determinantes específicos de virulencia en la proteína E mediante la aplicación de técnicas experimentales como la selección y caracterización de variantes de escape de neutralización en presencia de anticuerpos monoclonales anti proteína E⁴⁶.

Por otro lado el virus aislado del caso de FHD presenta una mutación no sinónima (L>R) en la proteína NS5 con respecto a los demás virus. La proteína de mayor tamaño y la más altamente conservada, es la NS5, y se cree que funciona como polimerasa viral en los flavivirus⁴⁷. El mapeamiento de la mutación en la proteína NS5 utilizando el modelo tridimensional indica que esta alteración mapea en el dominio N-terminal de la proteína y podría estar relacionada a actividad de S-adenosyl methionine transferase, implicada en el proceso de traducción⁴⁸. Estudios complementarios utilizando la tecnología de replicones y/o genomas infecciosos permitirán determinar la real contribución de cada una de las mutaciones en el fenotipo viral.

Los aislados de los 4 pacientes paraguayos, presentaron dos mutaciones en la región 3'NTR con respecto a la cepa de referencia, pero idénticas entre ellos. Aunque se ha visto que esta región contiene secuencias esenciales para la replicación viral, y ha sido correlacionada con la virulencia en otros flavivirus¹⁹, en este caso las mutaciones no pueden ser correlacionadas con la patogenicidad, ya que fueron comunes a los diferentes cuadros clínicos. De cualquier modo, la estructura secundaria prevista de la 3'NTR de los virus paraguayos es considerablemente diferente a la del virus BR-03/290, DF, lo que demostraría la variación que van sufriendo los virus DEN-3 que circulan en la región.

Estudios estructurales y funcionales posteriores permitirán dilucidar las implicancias de las mutaciones encontradas en los virus aquí estudiados, y confirmar si las estructuras halladas se mantienen

consistentemente en otros ciclos de transmisión viral.

Actualmente estamos caracterizando genéticamente otros aislados virales provenientes de las diferentes formas clínicas observadas en la epidemia, con el objeto de mapear eventuales marcadores moleculares de virulencia y mecanismos envueltos en la patogénesis del dengue. De cualquier modo comunicamos aquí los primeros resultados obtenidos en la investigación.

BIBLIOGRAFÍA

1. World Health Organization, 1997. Dengue Haemorrhagic Fever: Diagnosis, Treatment, Prevention and Control. Second edition. Geneva: World Health Organization.
2. Innis BL. Dengue and dengue hemorrhagic fever. In: Porterfield JS, ed. Kass Handbook of Infectious Diseases: Exotic Virus Infections. 1st ed. London: Chapman and Hall Medical, 1995:103–46.
3. Gubler DJ. Dengue and dengue hemorrhagic fever. Clin Microbiol Rev 1998; 11(3):480–96.
4. Gibbons RV, Vaughn DW. Dengue: an escalating problem. BMJ 2002; 324: 1563–1566.
5. Kamath SR, Ranjit S. Clinical features, complications and atypical manifestations of children with severe forms of dengue haemorrhagic fever in South India. Indian J Pediatr [serial online] 2006 [cited 2007 Feb 28];73:889–895. Available from: <http://www.ijppediatric-sindia.org/article.asp>
6. Ling LM, Wilder-Smith A, Leo YS. Fulminant Hepatitis in dengue haemorrhagic fever. J Clin Virol 2007; 38: 265–268.
7. Nogueira RM, Schatzmayr HG, Filippis AM, Santos FB, Cunha RV, Coelho JO, Souza LJ, Guimaraes FR, Araujo ES, Simone TS, Baran M, Teixeira G, Miagostovich MP. Dengue virus type 3, Brazil, 2002. Emerg Infect Dis 2005; 11: 1376–1381. sistenamente en otros ciclos de transmisión viral.
8. Nogueira RMR, Filippis AMB, Coelho JMO, Sequeira PC, Schatzmayr HG, Paiva FG, et al. Dengue virus in central nervous system in Brazil. Southeast Asian J Trop Med Public Health 2002; 33:68–71.
9. Leao RN, Oikawa T, Rosa ES, Yamaki JT, Rodrigues SG, Vasconcelos HB, et al. Isolation of dengue 2 virus from a patient with central nervous system involvement (transverse myelitis). Rev Soc Bras Med Trop 2002; 35: 401–4.
10. Halstead SB. Pathogenesis of dengue: challenges to molecular biology. Science 1988;239:476–81.
11. Rosen L. “The emperor’s new clothes” revisited, or reflections on the pathogenesis of dengue haemorrhagic fever. Am J Trop Med Hyg 1977; 26:337–343.
12. Burke DS, Nisalak A, Johnson DE, Scott RM. A prospective study of dengue infections in Bangkok. Am J Trop Med Hyg 1988;38:172–80.
13. Halstead SB, Nimmannitya S, Yamarat C, Russell PK. Hemorrhagic fever in Thailand; recent knowledge regarding etiology. Jpn J Med Sci Biol 1967; 20:96–103.
14. Halstead SB, Nimmannitya S, Cohen SN. Observations related to pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. IV. Relation of disease severity to antibody response and virus recovered. Yale J Biol Med 1970; 42:311–28.
15. Russell PK, Yuill TM, Nisalak A, Udomsakdi S, Gould D, Winter PE. An insular outbreak of dengue hemorrhagic fever. II. Virologic and serologic studies. Am J Trop Med Hyg 1968;17:600–8.
16. Sangkawibha N, Rojanasuphot S, Ahandrik S, et al. , Risk factors in dengue shock syndrome: a prospective epidemiologic study in Rayong, Thailand. I: the 1980 outbreak. Am J Epidemiol 1984;120:653–69.
17. Rosen L. The pathogenesis of dengue haemorrhagic fever: a critical appraisal of current hypotheses. S Afr Med J 1986; (Suppl):40–2.
18. Rico-Hesse R, Harrison LM, Salas RA, et al. Origins of dengue type 2 viruses associated with increased pathogenicity in the Americas. Virology 1997; 230:244–51.
19. Leitmeyer KC, Vaughn DW, Watts DM, et al. Dengue virus structural differences that correlate with pathogenesis. J Virol 1999;73:4738–47.
20. Chiewsilp P, Scott RM, Bhamarapravati N. Histocompatibility antigens and dengue hemorrhagic fever. Am J Trop Med Hyg 1981;30:1100–5.
21. Bravo Gonzalez JR, Guzman Tirado MG, Kouri Flores G. Encuesta seroepidemiologica retrospectiva a virus dengue en el municipio Cerro. Metodologia. Rev Cubana Med Trop 1985;37:259–68.

22. Guzman MG, Kouri G, Morier L, Soler M, Fernandez A. A study of fatal hemorrhagic dengue cases in Cuba, 1981. *Bull Pan Am Health Organ* 1984;18:213–20.
23. Anto S, Sebodo T, Sutaryo, Suminta, Ismangoen. Nutritional status of dengue haemorrhagic fever in children. *Paediatrics Indonesia* 1983;23:15–24.
24. Thisyakorn U, Nimmannitya S. Nutritional status of children with dengue hemorrhagic fever. *Clin Infect Dis* 1993;16:295–7.
25. Messer WB, Gubler DJ, Harris E, Sivananthan K, De Silva AM. Emergence and global spread of a dengue serotype 3, subtype III virus. *Emerg Infect Dis* 2003; 9: 800-808.
26. Lanciotti, R. S., J. G. Lewis, D. J. Gubler, and D. W. Trent. Molecular evolution and epidemiology of dengue-3 viruses. *J Gen Virol* 1994; 75:65–75.
27. Miagostovich M, Santos F, Fumian T, Guimaraes F, Costa E, Tavares F, Coelho J, Nogueira RM. Complete genetic characterization of a brazilian dengue virus type 3 strain isolated from a fatal outcome. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2006; Vol 101 N° 3.
28. Figueroa R, Ramos C. Dengue virus (serotype 3) circulation in endemic countries and its reappearance in América. *Arch Med Res* 2000; 31: 429-430
29. Chambers TJ, Chang SH, Galler R and Rice CM. Flavivirus genome organization, expression, and replication. *Annu Rev Microbiol* 1990; 44: 649-688.
30. McMin PC. The molecular basis of virulence of the encephalitogenic flaviviruses. *J Gen Virol* 1997; 78:2711-2722.
31. Holden KL, Harris E. Enhancement of dengue virus translation: role of the 3 untranslated region and the terminal 3 stem-loop domain. *Virology* 2004; 329:119-133.
32. Halstead SB, Heinz FX, Barret ADT, Roehrig JT. Dengue virus: molecular basis of cell entry and pathogenesis. *Vaccine* 2005; 23: 849-856.
33. Boletín Epidemiológico República del Paraguay. Vigilancia epidemiológica del Dengue en el Paraguay. Ed. Páez M. Ministerio de Salud Pública y Bienestar Social. Año 8 N° 24 2002: 1-4
34. Vazquez C, Bobadilla ML, Villalba S y Morán M. Aislamiento e identificación del virus Dengue circulante en el brote de abril a junio de 2001. III Congreso Paraguayo de Infectología 2001; Asunción-Paraguay.
35. Bobadilla ML, Vazquez C, Villalba S. Circulación simultánea de múltiples serotipos de dengue en Paraguay. Años 2002-2003. IV Congreso Paraguayo de Infectología 2003; Asunción-Paraguay.
36. Aquino VH, Anatriello E, Gonçalves P, Da Silva E, Vasconcellos P, Vieira D, Batista W, Bobadilla ML, Vázquez C Moran M, Figueiredo LT. Molecular epidemiology of dengue type 3 virus in Brazil and Paraguay.
37. Innis BL, Nisalak A, Nimmannitya S, et al. An enzyme-linked immunosorbent assay to characterize dengue infections where dengue and japanese encephalitis co-circulate. *Am J Trop Med Hyg* 1989; 40: 418-27.
38. Kuno G, Gómez I, Gubler DJ. An ELISA procedure for the diagnosis of dengue infections. *J Virol Methods* 1991; 33: 101-13
39. Gubler DJ, Kuno G, Sather GE, Velez M, Oliver A. Mosquito cell cultures and specific monoclonal antibodies in surveillance for dengue viruses. *Am J Trop Med Hyg* 1984; 33: 158-65.
40. Harris E, Roberts TG, Smith L, Selle J, Kramer LD, Valle S, Sandoval E, Balmaceda A. Typing of dengue viruses in clinical specimens and mosquitoes by single-tube multiplex reverse transcriptase PCR. *J Clin Microbiol* 1998;36(9): 2634-2639.
41. Ewing B, Hillier L, Wendl MC, Green P. Base-calling of automated sequencer traces using phred. II Error probabilities. *Genome Research*. 1998; 8(3): 175-185
42. Ewing B, Green P. Base-calling of automated sequencer traces using phred. II Error probabilities. *Genome Research*. 1998; 8(3):186-194.
43. Zucker M, Matthews DH, Turner DH. Algorithms and thermodynamics for RNA secondary structure prediction: A practical guide. In *RNA Biochemistry and Biotechnology*, NATO ASI Series, Kluwer Academic Publishers, 1999, pp. 11-43.
44. Kouri G, Guzman MG, Bravo JR, Triana C. Dengue hemorrhagic fever/dengue shock syndrome: lessons from the Cuban epidemic, 1981. *Bull WHO* 87 1989; 4:375-380.

45. Chen Y, Maguire T and Marks RM. Demonstration of binding of dengue virus envelope protein to target cells. *J Virol* 1996;70:8765-8772.
46. Roehrig JT, Bolin RA, Kelly RG. Monoclonal antibody mapping of the envelope glycoprotein of the dengue 2 virus, Jamaica. *Virology* 1998;246:317-328.
47. McMin PC. The molecular basis of virulence of the encephalitogenic flaviviruses. *J Gen Virol* 1997;78:2711-2722.
48. Rice CM, Lenches EM, Eddy SR, Shin J, Sheets RL, Strauss JH. Nucleotide Sequence of yellow fever virus: implications for flavivirus gene expression and evolution. *Science* 1985; 229:726-733.
49. Yap TL, Xu T, Chen YL, Malet H, Egloff MP, Canard B, Vasudevan SG, Lescar J. Crystal structure of the dengue virus RNA-dependent RNA polymerase catalytic domain at 1.85-angstrom resolution. *J Virol*. 2007;81(9):4753-65.
50. Duarte Dos Santos CN, Frenkiel MP, Courageot MP, Rocha CF, Vazeille-Falcoz CM, Wien WM, Rey FA, Deubel V, Després P. Determinants in the envelope E Protein and Viral RNA Helicase NS3 That Influence the Induction of Apoptosis in Responses to Infection with Dengue Type 1 Virus. *Virology* 2000; 274:292-308.