

ESTANDARIZACIÓN DE TÉCNICAS PARA EL DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE FLAVIVIRUS Y ALFAVIRUS.

STANDARIZATION OF MOLECULAR TECHNIQUES FOR DIAGNOSIS OF FLAVIVIRUS AND ALPHAVIRUS

Jesús Reyes O.¹; Guillermo Comach P.¹; Leticia Franco²; Daría Camacho G.¹

ABSTRACT

Flavivirus and alphavirus affect the health of humans. In Venezuela and particularly in Aragua, the communities have been affected by some members of these genus, such as dengue (DENV), and Chikungunya (CHIKV). DENV circulating in Aragua since 1989 generating outbreaks of clinical importance, while CHIKV made its appearance in 2014. In Aragua state, the diagnosis had been directed toward the detection of DENV, however the situation with CHIKV generates the need to expand the diagnosis spectrum to other viral agents. In the LARDIDEV we adapted two methodology of RT-PCR's previously described to detect members of these genus using flavivirus (DENV y Zika) and alphavirus (CHIKV) control strains. Both techniques were modified in the concentration of some reactants (MgCl₂, dNTP's, and primers) in the second reaction of PCR. The other conditions are kept equal to those originally described. Both techniques allowed amplified up to 1 fg of RNA of viral strains (Zika and CHIKV virus), but it could to amplify smaller amounts. In all cases, sharp bands according to the expected sizes using previously identified strains of DENV, CHIKV and Zika virus were obtained. The implementation of these methodologies will strengthen the timely diagnosis of members of this genus within the system of epidemiological surveillance of viral diseases.

KEY WORDS: Flavivirus, Alphavirus, Zika, Dengue, Chikungunya, Molecular diagnosis.

RESUMEN

Los flavivirus y alfavirus afectan la salud de los humanos. En Venezuela y de forma particular en Aragua, las comunidades se han visto afectadas por algunos de los miembros de estos géneros, como Dengue (DENV), y Chikungunya (CHIKV). DENV circula en Aragua desde 1989 causando brotes de importancia clínica, mientras que CHIKV hizo su aparición en 2014. En Aragua, el diagnóstico se había dirigido hacia la detección de DENV, sin embargo la situación con CHIKV generó la necesidad de ampliar el espectro diagnóstico hacia otros agentes virales. En el Laboratorio Regional de Diagnóstico e Investigación del Dengue y otras Enfermedades Virales se adaptaron dos protocolos de RT-PCR previamente descritos para detectar miembros de estos géneros haciendo uso de cepas controles para flavivirus (DENV y Zika) y alfavirus (CHIKV). Ambas técnicas sufrieron modificaciones en la concentración de algunos reactantes (MgCl₂, dNTP's, y cebadores) utilizados en la segunda reacción de PCR. El resto de las condiciones se mantuvieron iguales a las descritas originalmente. Las metodologías estandarizadas permitieron amplificar hasta 1 fg de ARN viral de los controles empleados (Zika y CHIKV) con posibilidad de amplificar cantidades menores a esta. En todos los casos se obtuvieron bandas nítidas e íntegras de acuerdo a los tamaños esperados haciendo uso de cepas previamente identificadas de DENV, CHIKV y Zika. La puesta en marcha de estas metodologías permitirá fortalecer el diagnóstico oportuno de miembros de estos géneros en el marco del sistema de vigilancia epidemiológica de enfermedades virales.

PALABRAS CLAVE: Flavivirus, Alfavirus, Zika, Dengue, Chikungunya, Diagnóstico molecular.

INTRODUCCIÓN

Los flavivirus y alfavirus conforman un grupo de agentes virales que son causa de enfermedad en el humano. El género flavivirus comprende 53 especies, pertenece a la familia Flaviviridae, y junto a otras familias y géneros, forman parte de los virus transmitidos por artrópodos. Entre los más conocidos, se encuentran: dengue (DENV), virus de la Encefalitis Japonesa (JEV), virus de la Encefalitis de San Luis (SLEV), fiebre amarilla (YFV) y el virus del Nilo Occidental (WNV).¹ Muchas de las infecciones que causan son asintomáticas, sin embargo pueden presentarse como una enfermedad febril que puede causar enfermedad amenazante para la vida.² En la región de las Américas, las infecciones que más

Recibido: 03/07/2015 Aprobado: 16/02/2016

¹Laboratorio Regional de Diagnóstico e Investigación del Dengue y otras Enfermedades Virales (LARDIDEV), Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad de Carabobo "Francisco Triana-Alonso" (BIOMED-UC), Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad de Carabobo, Sede Aragua, Maracay, Venezuela. ²Laboratorio de Arbovirus, Centro Nacional de Microbiología. Instituto de Salud Carlos III (ISCIII). Majadahonda, Madrid, España.

Correspondencia: darycamacho@yahoo.com

afectan a la población están representadas por las causadas por cualquiera de los serotipos de DENV.^{3,4} Las infecciones por YFV han cobrado importancia por su reemergencia en países Sudamérica y África.⁵ Otros flavivirus, como el WNV han ampliado su distribución y focos de transmisión.⁶ Asimismo, el virus Zika circulante en Asia y África, resulta de especial interés debido a que clínicamente presenta similitud con las infecciones causadas por DENV.⁷ En el caso de los alfavirus, se ha descrito que los mismos son de importancia médica por las manifestaciones clínicas que causan. Tal es el caso de los virus de la encefalitis equina del Este y Oeste (EEE y EEO), Semliki Forest (SF), Chikungunya (CHIKV) y O'nyong nyong (ONN).⁸ Entre estos, CHIKV ha sido causa de brotes en países de Asia, África, Europa y de forma más reciente en las Américas. En el Caribe (isla de San Martín), en 2013 se confirmaron casos de infección por CHIKV^{9,10} y desde entonces se ha reportado la transmisión local en 31 países de las Américas.^{11,12} De esta situación, no escapó Venezuela, debido a que en 2014 se confirmó la circulación de este virus.¹³

El diagnóstico de infecciones virales, como las causadas por flavivirus y alfavirus, se basa en la historia médica y en la presentación clínica de las mismas. Se puede realizar aislamiento viral, pero implica un alto nivel de bioseguridad. El diagnóstico inmunológico presenta inconvenientes asociados a la reactividad cruzada, mientras que el diagnóstico molecular realizado a través de técnicas, como la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, Polymerase Chain Reaction) ha sido de gran utilidad para la detección e identificación viral. Debido al impacto que poseen determinados miembros de los géneros flavivirus y alfavirus para la salud de la población en general, se consideró la puesta en marcha del diagnóstico de los mismos. Para ello, fueron consideradas dos metodologías moleculares reportadas previamente^{14,15} para amplificación del fragmento NS5 de flavivirus,¹⁴ así como de la región nsP4 del genoma de alfavirus.¹⁵ En ambos casos, las técnicas demostraron elevada sensibilidad y especificidad, lo que sugirió su utilidad como herramienta diagnóstica en la vigilancia epidemiológica de miembros de estos géneros. Debido a las cualidades descritas, en este reporte se muestra la amplificación de los fragmentos nucleotídicos descritos para flavivirus y alfavirus mediante ambas PCR's a través de la estandarización de determinados reactantes, para adaptarlas a las condiciones del Laboratorio Regional de Diagnóstico e Investigación del Dengue y otras Enfermedades Virales (LARDIDEV), con el fin de incorporar dichas técnicas como herramientas diagnósticas que permitan detectar la circulación de cualquiera de los miembros de los géneros mencionados.

MATERIAL Y MÉTODOS

Muestra biológica: estuvo constituida por diferentes cepas virales. Específicamente, los flavivirus Zika (MR766), DENV-1 (Hawaii), DENV-2 (NG"C"), DENV-3 (H-87) y DENV-4 (H-241) y el alfavirus CHIKV (genotipo ECSA, cepa DRC 1721).

Extracción del ARN viral: los ARN virales se extrajeron a partir de 140 µL de cada uno de los sobrenadantes de los cultivos celulares de las cepas previamente mencionadas mediante el uso del kit de extracción viral de ARN QIAamp QIAGEN® (QIAGEN Inc.; California, E.U.A) siguiendo las instrucciones del fabricante. El producto de la extracción se resuspendió en 60 µL de agua libre de nucleasas.

Amplificación de fragmentos genómicos correspondientes a especies del género Flavivirus y Alfavirus

Género Flavivirus (Virus Zika, DENV-1, DENV-2, DENV-3 y DENV-4): se empleó una metodología descrita previamente¹⁴ para la obtención de un fragmento de 143 pb de la región NS5 de los virus mencionados. Esta técnica sufrió algunas modificaciones, específicamente en la primera reacción se empleó MgSO₄ 2 mM, cebadores 50 pmol. En la segunda reacción el MgCl₂ fue utilizado a una concentración menor (2 mM) y dNTP's (0,08 mM), mientras que el resto de los reactantes quedaron en iguales condiciones.

Género Alfavirus (CHIKV): se amplificó un fragmento de 195 pb correspondiente al gen nsP4 del ARN de CHIKV mediante una RT-PCR descrita previamente.¹⁵ Se realizaron modificaciones en relación a algunos de los reactantes (MgSO₄, MgCl₂ y oligonucleótidos utilizados en la técnica. En la primera reacción, se aumentó la concentración de MgSO₄ (2 mM). En el caso de la segunda reacción de PCR, se disminuyó la concentración de MgCl₂ (2mM), los dNTP's se utilizaron a razón de 0,08 mM y los cebadores a 8 pmoles.

Determinación de la sensibilidad analítica: los ARN del flavivirus Zika y del alfavirus CHIKV fueron cuantificados mediante espectrofotometría a una absorbancia de 260 nm, para ser posteriormente diluidos en series de base 10 hasta alcanzar la cantidad de 1 fg de ARN. Cada uno de los ARN diluidos fue amplificado de acuerdo a las técnicas descritas.^{14,15}

Electroforesis en geles de Agarosa al 2%: los productos de las reacciones previamente descritas se

analizaron en geles de agarosa al 2% y fueron comparados con el marcador de tamaño molecular (100 bp DNA Step Ladder, Axygen). El resultado de la migración electroforética en los geles se observó en un equipo de fotodocumentación de geles (Gel Doc™ 2000 Gel Documentation Systems, BIORAD).

RESULTADOS

Luego de la extracción de los ARN virales de cepas previamente identificadas de los flavivirus Zika, DENV-1, DENV-2, DENV-3 y DENV-4, así como el alfavirus CHIKV en procedimientos separados, se procedió a realizar la amplificación de fragmentos de la región NS5 de las cepas de flavivirus¹⁴ y nsP4 en el caso del alfavirus.¹⁵ Inicialmente, se consideraron estrictamente las condiciones descritas, sin embargo fue necesario adecuar las concentraciones y cantidades de los reactantes MgSO₄, MgCl₂, dNTP's y cebadores, tal como se describió en la sección de material y métodos. Estos cambios permitieron obtener una banda única e íntegra en correspondencia con el tamaño esperado (143 pb) para los flavivirus Zika (Figura 1A) y DENV-1, DENV-2, DENV-3 y DENV-4 (Figura 1B). La RT-PCR para alfavirus también sufrió modificaciones, resultando igualmente en la amplificación de bandas con el tamaño esperado (195 pb) a partir del ARN de la cepa control de CHIKV (Figura 1C). Una vez obtenidos los resultados de la amplificación de los mencionados fragmentos para los controles utilizados para tal fin, se valoró la sensibilidad analítica de las técnicas. Para ello, los ARN del flavivirus Zika y del alfavirus CHIKV diluidos y analizados mediante las RT-PCR^{14,15} permitieron evidenciar la capacidad de estas técnicas para detectar una mínima cantidad de ARN (1 fg), tal como se observa en las figuras 2 y 3.

DISCUSIÓN

Entre los flavivirus y alfavirus^{2,16} destacan DENV y CHIKV, los cuales tienen en común, además de las manifestaciones clínicas, la capacidad de ser transmitidos por mosquitos del género *Aedes*. En relación a los flavivirus, en el país y en el estado Aragua se presenta una condición de hiperendemicidad para DENV¹⁷ establecida desde el año 1989, cuando Venezuela protagonizó el segundo brote de casos severos causados por DENV de mayor importancia en las Américas. En este evento se reportaron más de 6000 casos hemorrágicos con 73 muertes y se lograron identificar los serotipos DENV1, DENV2 y DENV4; los casos severos y fatales se asociaron al serotipo DENV2.¹⁸ En relación a este hecho, es importante destacar que la confirmación de los casos hemorrágicos de esta epidemia

ocurrió en el estado Aragua, específicamente en la ciudad de Maracay.¹⁹ Debido a la magnitud del problema, surgió la necesidad de fortalecer el sistema de vigilancia de enfermedades infecciosas en la entidad federal, donde funciona desde el año 1995 el Laboratorio Regional de Diagnóstico e Investigación del Dengue y otras Enfermedades Virales (LARDIDEV) como parte del sistema de vigilancia epidemiológica. El diagnóstico realizado se había circunscrito a la detección de cualquiera de sus serotipos, así como a Rubéola y Sarampión haciendo uso de metodologías inmunológicas y moleculares. Sin embargo, era una necesidad latente la incorporación de otras técnicas diagnósticas con el fin de fortalecer el proceso de vigilancia epidemiológica hacia otros agentes infecciosos, causantes de patologías de impacto epidemiológico y que además cursaran con manifestaciones clínicas similares. Este hecho se vio reforzado con la situación acaecida en el país durante el año 2014, cuando ocurrió en Venezuela un brote causado por CHIKV,¹³ un miembro del género alfavirus, que hasta 2005 había sido considerado un virus endémico en África, sudeste asiático y subcontinente de la India. Sin embargo, su ingreso a Europa en 2007 (Italia) y 2010 (Francia)²⁰ y posteriormente a las Américas²¹ generó alarma, debido a los antecedentes como agente causal de brotes explosivos en cualquiera de las zonas donde se había descrito su introducción. En 2013, CHIKV fue aislado en la isla de San Martín.⁹ Como se mencionó previamente, en Venezuela fue causa de enfermedad en 2014.¹³

Dadas las circunstancias epidemiológicas del país y particularmente del estado Aragua en relación a estos agentes infecciosos (DENV y CHIKV) y a la posibilidad de introducción de otros miembros de flavivirus y alfavirus, se decidió la incorporación al LARDIDEV de metodologías moleculares (RT-PCR) que permitieran la amplificación de regiones conservadas de los genomas de flavivirus y alfavirus, específicamente de fragmentos ubicados en NS5 y nsP4; respectivamente.^{14,15} Es importante destacar que en mayo de 2015 fueron diagnosticados en Brasil casos clínicos producidos por el virus Zika. Entre las recomendaciones de las autoridades de salud estuvo la puesta en marcha de técnicas para la detección del mismo en el laboratorio, mediante el uso de un ensayo genérico para diagnóstico de flavivirus, seguido de secuenciación genética para establecer la etiología específica.²² El virus Zika se había mostrado como un agente infeccioso que hasta hace poco había sido registrado solamente en Asia y África.⁷ La introducción de este virus en el país vecino, colocó en situación de alerta epidemiológica a Venezuela, por la posible circulación del mismo en nuestra región reforzando la necesidad de fortalecimiento del diagnóstico.

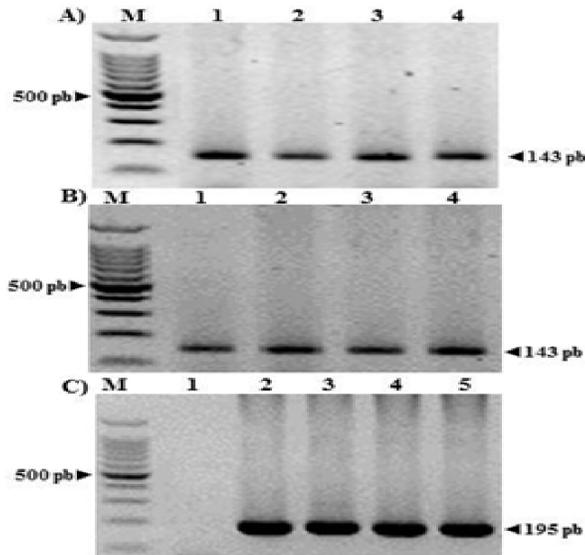


Figura 1. Electroforesis en gel de agarosa al 2% donde se observa la amplificación de fragmentos de 143 pb mediante la técnica RT-PCR a partir de ARN de los flavivirus Zika y DENV-1, DENV-2, DENV-3 y DENV-4 y fragmentos de 195 pb del alfavirus CHIKV. A) M. Marcador (100 pb DNA step ladder, Axygen). 1-4: virus Zika (cepa MR766), B) M. Marcador (100 pb DNA step ladder, Axygen). 1: DENV-1 (Hawái), 2: DENV-2 (NG" C"), 3: DENV-3 (H-87), 4: DENV-4 (H-241). C) M. Marcador (100 pb DNA step ladder, Axygen). 1: Control negativo, 2-5: CHIKV (cepa DRC 1721).

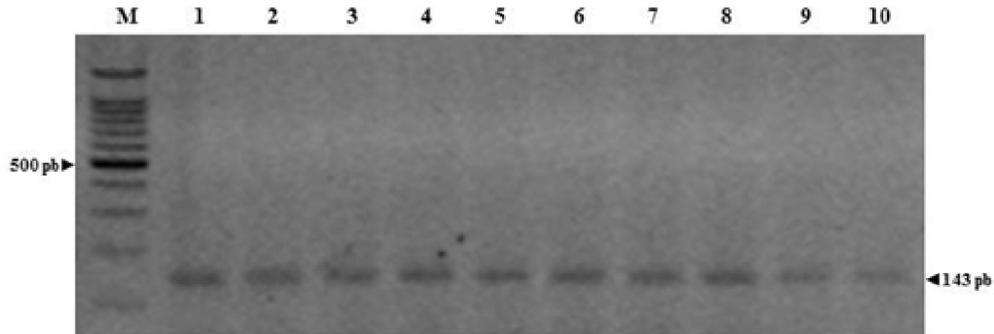


Figura 2. Electroforesis en gel de agarosa al 2% donde se observa la amplificación de un fragmento de 143 pb mediante la técnica RT-PCR a partir de distintas cantidades de ARN del flavivirus Zika (cepa MR766). M. Marcador (100 pb DNA step ladder, Axygen), 1: 1 μ g, 2: 100 ng, 3: 10 ng, 4: 1 ng, 5: 100 pg, 6: 10 pg, 7: 100 fg, 8: 10 fg, 9: 1 fg.

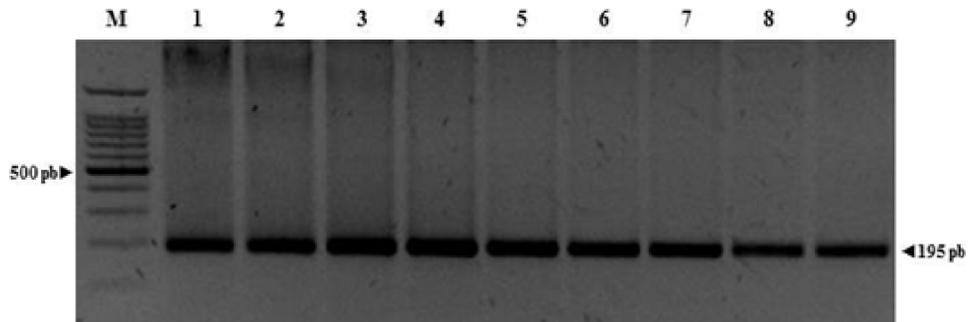


Figura 3. Electroforesis en gel de agarosa al 2% donde se observa la amplificación de un fragmento de 195 pb mediante la técnica RT-PCR a partir de distintas cantidades de ARN del alfavirus CHIKV (cepa DRC 1721). M. Marcador (100 pb DNA step ladder, Axygen), 1: 1 μ g, 2: 100 ng, 3: 10 ng, 4: 1 ng, 5: 100 pg, 6: 10 pg, 7: 100 fg, 8: 10 fg, 9: 1 fg.

En consecuencia, la estandarización de técnicas moleculares con fines diagnósticos o de investigación se realiza con el fin de determinar las condiciones adecuadas de reacción de todos los elementos que la componen. En el caso de la RT-PCR, el objetivo es amplificar regiones genómicas que se reflejen en bandas nítidas y reproducibles en los geles de agarosa, para lo cual es necesario ajustar condiciones en términos de temperatura, tiempos para la desnaturalización, hibridación de cebadores y extensión de la cadena del fragmento que desea amplificarse. Así mismo, deben considerarse las concentraciones de los componentes de la reacción (MgCl₂, MgSO₄, dNTP's, cebadores, Taq polimerasa y Transcriptasa Reversa). Es por ello, que aunque las condiciones de reacción para amplificación de fragmentos genómicos de flavivirus y alfavirus hayan sido descritas,^{14,15} es absolutamente necesario estandarizar las condiciones de reacción para su puesta en marcha de cada laboratorio.

Los resultados obtenidos en este reporte, indican que las técnicas adaptadas a las condiciones de trabajo del LARDIDEV, son óptimas para la amplificación de los controles empleados de los flavivirus (DENV y Zika) y alfavirus (CHIKV)^{14,15} y en consecuencia de muestras sospechosas. Estas técnicas tienen suficiente sensibilidad como para detectar un amplio espectro viral, incluyendo otras especies de flavivirus como JEV, SLEV, YFV y WNV. En el caso de alfavirus, además de CHIKV, la técnica es capaz de detectar EEE, EEO, SF, ONN, entre otros. En relación a la sensibilidad analítica, se observó la detección de hasta 1 fg de los productos; sin embargo, se evidenció la posibilidad de amplificación hasta el orden de los attogramos, particularmente en el caso de la RT-PCR para alfavirus donde aún en el carril 9 (Figura 3) se puede evidenciar una banda nítida. Estos resultados refuerzan aún más la elevada sensibilidad de estas técnicas. Adicionalmente, en términos de factibilidad ambos protocolos funcionaron en condiciones semejantes a las descritas originalmente^{14,15} con ligera

disminución de algunos de los reactantes para la segunda reacción de PCR, destacando de forma particular la reducción de la cantidad de cebadores a utilizar en la segunda reacción de PCR para alfavirus, lo que favorece en términos de economía el uso de los reactantes.

De modo que, para el LARDIDEV y la comunidad en general representa una gran ventaja la inclusión de estas técnicas, debido a que se abre la posibilidad de disponer de metodologías para la detección de miembros de ambos géneros virales, ampliando así la capacidad diagnóstica, más allá de la exclusiva detección de los serotipos de DENV.

Adicionalmente, con la entrada de CHIKV al país quedó confirmada la necesidad de contar con herramientas confiables en los laboratorios de salud pública, ya que indiscutiblemente factores como el cambio climático, el incremento en la frecuencia de viajes a zonas endémicas, así como la diseminación de reservorios y vectores, trae consigo la posibilidad de transmisión de enfermedades, lo que se traduce en la necesidad de aumentar la prevención de enfermedades transmitidas por vectores. Con la RT-PCR para alfavirus y flavivirus incorporada en el LARDIDEV se fortalece el diagnóstico y la vigilancia de miembros de estos agentes virales, con el fin de implementar en un futuro cercano técnicas para la detección específica de cualquiera de estos virus, que tal como se mencionó pueden ser causa de grandes estragos en las comunidades afectadas.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. María Joao Alves del Instituto Ricardo Jorge de Aguas de Moura (Portugal) por la gentil donación de la cepa de referencia del virus Zika MR766 (Uganda, 1947, N° acceso: AY632545) y al Instituto Carlos III (España) por la gentil donación del control de CHIKV (genotipo ECSA, cepa DRC 1721) a través del programa VIRORED-CYTED.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1) Gubler D, Kuno G, Markoff L. Flaviviruses. In: Knipe, DM, Howley, P.M., ed. *Fields Virology*. Philadelphia:Lippincott Williams and Wilkins; 2007, p. 1153-1252.
- 2) Burke, DS, Monath TP. Flaviviruses. In: Knipe, DM, Howley, P.M., ed. *Fields Virology*. Philadelphia:Lippincott Williams and Wilkins; 2001, p.852-921.
- 3) Organización Mundial de la Salud, Organización Panamericana de la Salud. Dengue(s/f). Disponible en: http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=264&Itemid=363 (Acceso: 17 de marzo de 2014).
- 4) Organización Mundial de la Salud. Dengue. Guías para el diagnóstico, tratamiento, prevención y control. 2009. Disponible en: http://www.who.int/topics/dengue/9789995479213_spa.pdf
- 5) Monath TP. Yellow fever: an update. *Lancet Infect Dis* 2001; 1: (1)11-20.
- 6) Briese T, Jia XY, Huang C, Grady LJ, Lipkin WI. Identification of a Kunjin/West Nile-like flavivirus in brains of patients with New York encephalitis. *The Lancet* 1999; 354: 1261-1262.
- 7) Hayes EB. Zika virus outside Africa. *Emerg Infect Dis* [serial on the Internet] 2009; Disponible en: <http://www.cdc.gov/EID/content/15/9/1347.htm>. (Acceso: 20 de marzo de 2015).
- 8) Strauss, JH, Strauss EG. The alphaviruses: gene expression, replication and evolution. *Microbiol Rev* 1994; 58:(3) 491-562.
- 9) Van Bortel W, Dorleans F, Rosine J, Bateau A, Rousseau D, Matheus S, et al. Chikungunya outbreak in the Caribbean region, December 2013 to March 2014, and the significance for Europe. *Euro Surveill* 2014 ;19(13):pii=20759. Disponible en: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=20759>. (Acceso: 20 de mayo de 2014).
- 10) Organización Panamericana de la Salud/Organización Mundial de la Salud.s/f. Chikungunya. Disponible en : http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=9468%3Achikungunya&catid=6648%3Amedia-center-fact-sheets&Itemid=40721&lang=es. (Acceso: 20 de mayo de 2015).
- 11) Staples E, Hills S, Powers A. Chikungunya, 2014. Disponible en: <http://wwwnc.cdc.gov/travel/yellowbook/2014/chapter-3-infectious-diseases-related-to-travel/chikungunya> (Acceso 14 de noviembre de 2014).
- 12) Organización Panamericana de la Salud/Center for Diseases Control and Prevention, 2014. Preparación y respuesta ante la eventual introducción del virus chikungunya en las Américas. Disponible en: http://www1.paho.org/hq/dmdocuments/CHIKV_Spanish.pdf. (Acceso 30 de octubre de 2014).
- 13) Ministerio del Poder Popular para la Salud. Información oficial de los casos de Chikungunya en Venezuela, 2014. Disponible en: http://www.mpps.gob.ve/index.php?option=com_content&view=article&id=6645&Itemid=18. (Acceso 12 de noviembre de 2014).
- 14) Sánchez-Seco MP, Rosario D, Domingo C, Hernández L, Valdés K, Guzmán MG, et al. Generic RT-nested-PCR for detection of ?aviviruses using degenerated primers and internal control followed by sequencing for speci?c identi?cation. *J of V Methods* 2005; 126:(1-2) 101-109.
- 15) Sánchez-Seco MP, Rosario D, Quiroz E, Guzmán G, Tenorio A, et al. A generic nested-RT-PCR followed by sequencing for detection and identification of members of the alphavirus genus. *J of V Methods* 2001; 95:(1-2)153-161.
- 16) Griffin D. Alphaviruses. In: Knipe, DM, Howley, P.M., ed. *Fields Virology*. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins; 2001; p. 745-785.
- 17) Rico-Hesse R. Molecular evolution and distribution of dengue viruses type 1 and 2 in nature. *Virology* 1990; 174:479-493.
- 18) Pan American Health Organization. Dengue hemorrhagic fever in Venezuela. *Epidemiol Bull* 1990; 11:7-9.
- 19) Barrera R, Delgado N, Jiménez M & Villalobos I. Estratificación de una ciudad hiperendémica en dengue hemorrágico. *Pan Am J Public Health* 1992; 8(4) 225-233.
- 20) Angelini R, Finarelli AC, Angelini P, Po C, Petropulacos K, Macini P, et al. An outbreak of chikungunya fever in the province of Ravenna, Italy. *Euro Surveill*. 2007; 12(36):pii:3260.
- 21) Staples E, Hills S, Powers A. Chikungunya, 2014. Disponible en: <http://wwwnc.cdc.gov/travel/yellowbook/2014/chapter-3-infectious-diseases-related-to-travel/chikungunya> (Acceso 14 de noviembre de 2014).
- 22) Organización Panamericana de la Salud/Organización Mundial de la Salud. 2015. Alerta epidemiológica. Infección por virus Zika. Disponible en: http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&task=doc_view&Itemid=270&gid=30076&lang=es. (Acceso 21 de mayo de 2015).