

ARTÍCULO ORIGINAL

Análisis filogenético del virus del chikungunya en Colombia: evidencia de selección purificadora en el gen *E1*

Katherine Laiton-Donato¹, José A. Usme-Ciro², Angélica Rico¹, Lissethe Pardo¹, Camilo Martínez¹, Daniela Salas³, Susanne Ardila⁴, Andrés Páez^{1,2}

¹ Grupo de Virología, Dirección de Redes en Salud Pública, Instituto Nacional de Salud, Bogotá, D.C., Colombia

² Departamento de Ciencias Básicas, Universidad de La Salle, Bogotá, D.C., Colombia

³ Grupo de Enfermedades Transmitidas por Vector, Dirección de Vigilancia y Análisis de Riesgo en Salud Pública, Instituto Nacional de Salud, Bogotá, D.C., Colombia

⁴ Grupo de Entomología, Dirección de Redes en Salud Pública, Instituto Nacional de Salud, Bogotá, D.C., Colombia

Introducción. El virus del chikungunya, perteneciente al género *Alphavirus* de la familia *Togaviridae*, es un virus ARN de 11,8 kb, de cadena sencilla y polaridad positiva, transmitido por *Aedes* spp. Se han identificado tres genotipos a nivel mundial: el de Asia, el del este-centro-sur de África (*East/Central/South African*, ECSA) y el de África occidental (*West African*, WA). La fiebre del chikungunya es una enfermedad febril aguda, acompañada principalmente de inflamación en las articulaciones y erupción cutánea. Después de su aparición en las Américas en el 2013, los primeros casos en Colombia ocurrieron en septiembre de 2014 y hasta junio del 2015 se habían notificado 399.932 casos.

Objetivo. Identificar el genotipo o los genotipos responsables de la primera epidemia por el virus del chikungunya en Colombia y la variabilidad genética asociada a su dispersión en el territorio nacional.

Materiales y métodos. Se seleccionaron muestras de suero de pacientes con síntomas indicativos de fiebre del chikungunya durante 2014 y 2015. Se hizo una transcripción inversa seguida de reacción en cadena de la polimerasa del gen *E1*, así como su secuenciación, análisis filogenético y análisis de evolución adaptativa.

Resultados. Se demostró la presencia exclusiva del genotipo de Asia en Colombia. Se registró un promedio de 0,001 sustituciones de bases por sitio, una identidad de 99,7 a 99,9 % en los nucleótidos y de 99,9 % en los aminoácidos entre las secuencias colombianas y las secuencias de las Américas. Los análisis de evolución adaptativa indicaron una fuerte selección purificadora en el gen *E1*.

Conclusiones. Se determinó la circulación del genotipo de Asia del virus del chikungunya como la causa de la primera epidemia en Colombia. Es necesario continuar con la vigilancia de genotipos, con el fin de detectar posibles cambios en la epidemiología, la eficacia (*fitness*) viral y la patogenicidad del virus.

Palabras clave: virus del chikungunya, vigilancia, genotipo, filogenia, Colombia.

doi: <http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v36i0.2990>

Phylogenetic analysis of Chikungunya virus in Colombia: Evidence of purifying selection in the *E1* gene

Introduction: Chikungunya virus (CHIKV) is a single-stranded positive sense RNA virus that belongs to the *Alphavirus* genus of the family *Togaviridae*. Its genome is 11.8 kb in length, and three genotypes have been identified worldwide: Asian, East/Central/South African (ECSA) and West African. Chikungunya fever is an acute febrile disease transmitted by *Aedes* spp. that usually presents with polyarthralgia and cutaneous eruption. Following introduction of the virus to the Americas in 2013, the first cases in Colombia occurred in September of 2014, and they reached a cumulative total of 399,932 cases by June of 2015.

Objective: To identify the genotype or genotypes responsible for the current epidemic in Colombia and to describe the genetic variability of the virus in the country.

Materials and methods: Serum samples from patients presenting with symptoms compatible with Chikungunya fever during 2014-2015 were selected for the study. RT-PCR products of the *E1* gene from these samples were used for sequencing and subsequent phylogenetic and adaptive evolution analyses.

Contribución de los autores:

Katherine Laiton-Donato y José A. Usme-Ciro: concepción y diseño del estudio

Todos los autores participaron en el análisis y la interpretación de los resultados, la revisión crítica del manuscrito, la aprobación de la versión final y de todos los aspectos del manuscrito.

Results: The study identified only the presence of the Asian genotype in Colombia. Comparing the Colombian sequences with other sequences from the Americas revealed an average of 0.001 base substitutions per site, with 99.7% and 99.9% nucleotide identity and 99.9% amino acid identity. The adaptive evolution analysis indicated that the *E1* gene is under strong purifying selection.

Conclusions: The first epidemic of Chikungunya fever in Colombia was caused by the circulation of the virus Asian genotype. Further genotypic surveillance of the virus in Colombia is required to detect possible changes in its epidemiology, fitness and pathogenicity.

Key words: Chikungunya virus, surveillance, genotype, molecular epidemiology, phylogeny, Colombia.

doi: <http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v36i0.2990>

El virus del chikungunya pertenece al género *Alphavirus* de la familia *Togaviridae*, y es un importante patógeno reemergente transmitido por mosquitos del género *Aedes*. Es un virus encapsulado de 60 a 70 nm de diámetro, el cual posee una cápside de simetría icosaédrica que alberga un genoma de ARN de cadena sencilla y polaridad positiva de 11,8 kb, aproximadamente (1). El genoma del virus codifica para cuatro proteínas no estructurales (nsP1 – nsP4), las cuales participan en la replicación del ARN viral y en la producción de ARN mensajero (ARNm) subgenómico, el cual codifica, a su vez, para las cinco proteínas estructurales C, E3, E2, 6K y E1. La proteína E1 forma heterodímeros con E2, los cuales son transportados a la membrana celular para hacer parte de los viriones maduros luego de la gemación de las nucleocápsides (2).

El virus fue aislado por primera vez e identificado como el agente etiológico responsable de un brote de enfermedad febril en Tanzania entre 1952 y 1953 (3).

La fiebre del chikungunya es una enfermedad febril aguda, con un periodo de incubación de dos a 12 días, cuyas principales manifestaciones clínicas incluyen fiebre alta, mialgias, artralgias o artritis, linfadenopatías, dolores multifocales y erupción cutánea (1). La fase aguda de la enfermedad puede resolverse en un periodo de siete a 14 días, en tanto que la fase crónica, caracterizada por manifestaciones reumatológicas, puede persistir durante meses e incluso años (4).

El virus aumentó su rango de distribución entre los años 60 y 70, con brotes en diversos países asiáticos y en el subcontinente indio. En el 2004

emergió nuevamente de forma epidémica en el este de África, y rápidamente se distribuyó en países tropicales y subtropicales de África, Asia y Oceanía (5,6). En 2013 llegó a la región de las Américas a través de la isla Saint Martin y en poco tiempo se diseminó por diversas islas del Caribe y varios países de la región (7-9).

En Colombia el primer caso de fiebre del chikungunya importado se registró en Cali el 19 de junio de 2014, y los primeros casos de transmisión autóctona se notificaron en septiembre de 2014, con un total de 399.932 casos y 39 muertes desde el inicio de la epidemia hasta la semana epidemiológica 25 de 2015 (10), lo cual es el resultado de su transmisión en una población humana vulnerable en zonas con gran densidad del vector *Aedes aegypti*.

El análisis filogenético de las cepas del virus del chikungunya que circulan a nivel mundial ha permitido la identificación de tres linajes denominados genotipo de Asia, genotipo del este-centro-sur de África (*East/Central/South African*, ECSA) y genotipo de África occidental (*West African*, WA) (11-13); se estima que el ancestro común más reciente de los tres genotipos pudo haberse originado hace 500 años, aproximadamente, y que la divergencia entre el genotipo de Asia y el de ECSA pudo haber ocurrido hace 150 años (14). En un análisis del gen *E1* se encontró una tasa de sustitución de $1,4 \times 10^{-3}$ por sitio por año (15).

El genotipo de Asia ha sido el principal responsable de la enfermedad en las islas del Caribe y en Centroamérica y Suramérica (9,16); sin embargo, recientemente se reportó la presencia del genotipo ECSA en Brasil (17). Por ello, es de vital importancia determinar los genotipos de los virus responsables de la epidemia actual en Colombia y la variabilidad genética asociada a su diseminación en el territorio nacional, lo cual contribuye al conocimiento de la dinámica de circulación y transmisión del virus.

Correspondencia:

Andrés Páez, Laboratorio de Virología, Instituto Nacional de Salud, Avenida Calle 26 N° 51-20, Bogotá, D.C., Colombia
Teléfono: (571) 220 7700, extensión 1405
apaezm@ins.gov.co y apaez@unisalle.edu.co

Recibido: 21/07/15; aceptado: 22/10/15

Materiales y métodos

Muestras clínicas

Se seleccionaron 29 muestras de suero remitidas al Laboratorio de Virología del Instituto Nacional de Salud entre 2014 y 2015, por sospecha clínica de fiebre del chikungunya en el marco del programa de vigilancia virológica del virus a nivel nacional.

Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real

En 18 de las 29 muestras, la detección del virus se hizo mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real con el gen *nsP4* y utilizando el estuche *SuperScript III Platinum One-step*[®] (Invitrogen). Se utilizaron 0,4 mM de cada dNTP, 10 pmol de los oligonucleótidos CHIKV 6856/CHIKV 6981c y 5 µM de la sonda CHIKV 6919-FAM diseñados previamente, y 1 µl de la mezcla de enzimas (18), para un volumen final de la reacción de 25 µl. El perfil térmico incluyó un paso de transcripción inversa a 50 °C durante 30 minutos, la activación de la ADN polimerasa *Taq Hot Start* a 94 °C durante 15 minutos, 45 ciclos a 95 °C durante 15 segundos y a 60 °C durante un minuto para su hibridación y extensión.

Aislamiento viral

Las 11 muestras restantes se diluyeron en medio esencial mínimo de Eagle (E-MEM) en proporción de uno a diez y, posteriormente, se utilizaron en el intento de aislamiento viral inoculando 200 µl en cultivos de células Vero. La fase de adhesión se llevó a cabo a 37 °C durante una hora, momento en el cual se añadieron 800 µl de E-MEM con suplemento de 2 % de suero fetal bovino (FBS) y la solución tampón HEPES. Los cultivos se incubaron a 37 °C en una atmósfera con CO₂. Los sobrenadantes de los aislamientos se recolectaron cuando se observó el efecto citopático, o a los cinco días de infección en caso de no observarse dicho efecto.

Extracción de ARN

El ARN viral se extrajo a partir de 18 muestras de suero y de 11 sobrenadantes de cultivo, utilizando el siguiente protocolo recomendado por el fabricante del estuche comercial *QIAamp Viral RNA Mini Kit*[®] (Qiagen Inc., Chatsworth, CA, USA): se mezclaron 140 µl de muestra con 560 µl de solución tampón AVL y 5,6 µl de ARN *carrier*; luego, se agregaron 500 µl de etanol absoluto y el volumen total se pasó a través de una columna de sílice mediante centrifugación. Posteriormente, se adicionaron 500 µl de solución tampón AW1 y 500 µl de AW2 para eliminar contaminantes y, por último, se eluyó mediante la adición de 60 µl de solución tampón AVE con centrifugación.

Amplificación del gen E1 mediante transcripción inversa seguida de PCR

La PCR en tiempo real para la amplificación de un fragmento de 1.666 pares de bases (pb) que incluía el gen *E1* completo, se hizo utilizando el estuche *QIAGEN One-Step RT-PCR kit*[®] (Qiagen Inc., Chatsworth, CA, USA) y los oligonucleótidos diseñados en este estudio (cuadro 1).

Se utilizaron 10 pmol de los oligonucleótidos CHIKseq_17F y CHIKV_4R, 5 µl de solución tampón 5X (que incluía 12,5 mM de MgCl₂), 1 µl de la mezcla de enzimas, 0,4 mM de cada dNTP y la solución Q en una concentración final de 1X para un volumen final de 25 µl. El perfil térmico consistió en un paso de transcripción inversa a 41 °C durante 45 minutos, un paso de activación de la ADN polimerasa *Taq Hot Start* a 94 °C durante 15 minutos, 40 ciclos a 94 °C durante 30 segundos para la desnaturalización, a 58 °C durante 30 segundos para la hibridación de oligonucleótidos, y a 72 °C durante dos minutos para la extensión, seguidos de una extensión final a 72 °C durante cinco minutos. Los amplicones se purificaron a partir de las reacciones de RT-PCR en tiempo real con el estuche comercial *QIAquick PCR Purification Kit*[®] (Qiagen Inc., Chatsworth, CA, USA).

Cuadro 1. Oligonucleótidos diseñados para la amplificación y secuenciación del gen *E1* del virus del chikungunya

Oligonucleótido	Uso	Secuencia 5'-3'	Posición genómica ¹
CHIKseq_17F	PCR en tiempo real y secuenciación	GTAGTTKTGTCAAGTGGCCTCGTTC ²	9646
CHIKseq_19F	Secuenciación	CCRTACTCTCAGGCACCATCT ²	10687
CHIKV_4R	PCR en tiempo real y secuenciación	TTAGTGCCTGCTRAACGACACG ²	11313
CHIKseq_2R	Secuenciación	CGCTCTTACCGGGTTTGTTGCTAT	10797
CHIKseq_3R	Secuenciación	CTTCTCCACATGTGCTTCGCTCA	10323

¹ Con respecto a la secuencia NC_004162.2 depositada en el Genbank

² Según el código de ambigüedad en nucleótidos de la *International Union of Pure and Applied Chemistry* - IUPAC

Secuenciación y edición de secuencias

Las secuencias se obtuvieron usando los oligonucleótidos descritos en el cuadro 1. Se agregaron 10 ng de cada amplicón a una mezcla de reacción que contenía 1 µl de *BigDye Terminator Cycle Sequencing*® v3.1 (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA), 3,2 pmol del oligonucleótido específico y 1,5 µl de solución tampón 5X, en un volumen final de 10 µl. El perfil térmico fue el siguiente: a 96 °C durante un minuto; 25 ciclos a 96 °C durante 10 segundos, a 50 °C durante 5 segundos y a 60 °C durante 4 minutos. Las reacciones se purificaron con el estuche *Big Dye XTerminator*® (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA) y posteriormente se procesaron mediante el analizador genético ABI3130 (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA). Las secuencias se editaron y ensamblaron mediante el módulo SeqMan del programa *LaserGene*®, v8.1 (DNASTAR Inc.).

Análisis filogenético

Con el fin de establecer la relación filogenética entre las cepas del virus del chikungunya circulantes en Colombia y las que han circulado a nivel mundial, se generó una matriz de secuencias correspondientes al gen *E1* obtenidas en el presente estudio (posiciones de los nucleótidos 9994-11313 con respecto a la secuencia NC_004162.2), y las secuencias depositadas en el GenBank correspondientes a los tres genotipos, las cuales fueron alineadas mediante el programa Clustal X2.1 (19).

Se estimó el modelo de sustitución de nucleótidos que mejor se ajustara a la matriz de secuencias teniendo en cuenta el criterio de información de Akaike (AIC), mediante la herramienta jModelTest v2.1.3 (20).

Se hizo una inferencia bayesiana mediante el método de Monte Carlo vía cadenas de Markov (MCMC) con el programa MrBayes 3.2.6 (21); se utilizó el modelo de sustitución de nucleótidos GTR, y se evaluaron cuatro MCMC (tres frías, una caliente) en 1'000.000 de generaciones con muestreos cada 100 generaciones para un total de 10.000 árboles.

La convergencia de los parámetros estadísticos se determinó usando el programa Tracer 1.6 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/tracer/>). Se descartaron 2.000 generaciones y los valores de probabilidades *a posteriori* se obtuvieron a partir de los 32.000 árboles resultantes.

La inferencia filogenética se hizo con el programa MEGA 6.0 (22) mediante los métodos de *neighbor-joining*, el modelo de sustitución de nucleótidos Kimura 2, parámetros con 1.000 réplicas *bootstrap* de máxima verosimilitud, y el modelo de sustitución de nucleótidos GTR con 1.000 réplicas *bootstrap*.

Los árboles de consenso se visualizaron mediante el programa FigTree v1.4.2 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>) y se editaron en el programa MEGA 6.0 (22).

Análisis de diversidad genética y evolución adaptativa

Se estimaron las distancias genéticas dentro del genotipo, entre genotipos y para el grupo representado por las secuencias obtenidas en el estudio utilizando el modelo evolutivo Kimura 2 y los parámetros en el programa MEGA 6.0 (22).

Con el fin de establecer las posibles fuerzas que han moldeado la evolución del virus, se hizo un primer análisis utilizando diferentes pruebas de neutralidad: la prueba estadística D de Tajima (23) y los tests F* y D* de Fu y Li (24) utilizando el programa DnaSP, versión 5.10.01 (25).

Para determinar los codones específicos de la secuencia que podrían estar sujetos a selección, se analizó la matriz por medio del servidor Datamonkey (<http://www.datamonkey.org>) (26).

Se determinó la razón del número de sustituciones no sinónimas por sitio no sinónimo sobre el número de sustituciones sinónimas por sitio sinónimo (*divergence at nonsynonymous and synonymous sites*, dN/dS).

En todos los análisis se usó el modelo de sustitución GTR (*generalised time reversible*) y un nivel de significación de $p < 0,1$. Se seleccionaron los sitios que presentaron significación estadística mediante los métodos de máxima verosimilitud de probabilidad de efectos fijos (*Fixed Effects Likelihood*, FEL), de probabilidad interna de efectos fijos (*Internal FEL*, IFEL) y de *single likelihood ancestor counting* (SLAC).

Resultados

El virus del chikungunya en Colombia

En Colombia hubo varias alertas por casos importados del virus del chikungunya antes del reporte de los primeros casos autóctonos en el departamento de Bolívar, en septiembre de 2014 (27). Después de su establecimiento, el virus ha tenido un comportamiento epidémico durante el

periodo 2014-2015 (figura 1), y logró colonizar una gran proporción de los municipios con presencia del vector *A. aegypti* (figura 2).

Circulación del genotipo de Asia del virus del chikungunya en Colombia

En el presente estudio se secuenció el gen *E1* completo en un total de 29 sueros o sobrenadantes de cultivo celular provenientes de 17 departamentos colombianos (cuadro 2), es decir, 53 % de los departamentos con reporte de casos confirmados de la enfermedad.

Las topologías obtenidas mediante inferencia bayesiana (figura 3) y los métodos de máxima verosimilitud y de *neighbor joining* (archivos complementarios 1 y 2, disponibles en: doi: <http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v36i0.2990>), evidenciaron concordancia en los soportes *bootstrap* (mayores de 85 %) para las ramas correspondientes a los genotipos y los principales linajes dentro de cada genotipo. Las secuencias colombianas mostraron una estrecha relación filogenética con cepas del genotipo de Asia provenientes de la isla Saint Martin, las Islas Vírgenes, México y Brasil.

Diversidad genética y evolución adaptativa

Al estimar la diversidad genética, se evidenció un promedio de 0,001 sustituciones de bases por sitio entre cada par de secuencias colombianas del virus y las secuencias reportadas en el continente americano (Saint Martin, Islas Vírgenes, Brasil, México), con una identidad de 99,7 a 99,9 % a nivel de nucleótidos y de 99,9 % a nivel de aminoácidos. Entre las secuencias colombianas y las demás secuencias pertenecientes al genotipo de Asia se estimó un promedio de 0,005 sustituciones de bases por sitio entre cada par de secuencias.

En los análisis de evolución adaptativa, las pruebas estadísticas de neutralidad presentaron las siguientes estimaciones: en la D de Tajima, -0,28665 ($p > 0,10$, no significativo), y en el test D* de Fu y Li, 0,93863 ($p > 0,10$, no significativo) y en el test F*, 0,52645 ($p > 0,1$, no significativo). El valor global de dN/dS fue 0,0517; el codón 145 fue el único seleccionado positivamente mediante los métodos FEL e IFEL, con un valor de 0,053 ($p < 0,1$, significativo). Mediante los métodos SLAC, FEL e IFEL ($p < 0,1$), se demostró la existencia de un gran número de codones sometidos a una fuerte selección negativa (cuadro 3).

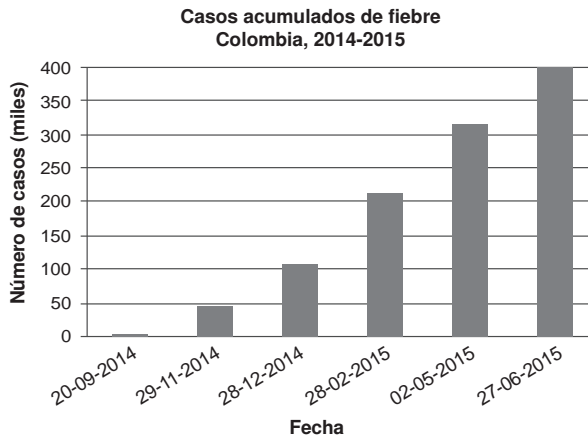


Figura 1. Casos acumulados de fiebre del chikungunya, Colombia, 2014-2015

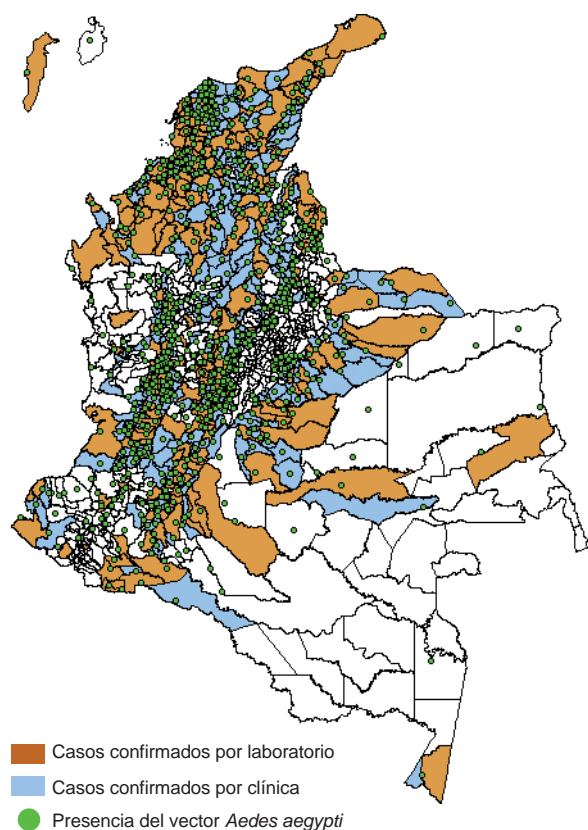


Figura 2. Distribución municipal de *Aedes aegypti* y casos confirmados de fiebre del chikungunya durante el 2015

Discusión

Desde la confirmación de la circulación autóctona del virus de chikungunya en septiembre de 2014, su transmisión en Colombia ha mostrado un patrón epidémico en el cual han contribuido de forma determinante diversos factores. En primer lugar,

Cuadro 2. Secuencias del virus del chikungunya, Colombia, 2014-2015

Identificación	Localización (departamento, municipio)	Año	Número de acceso en el Genbank
440191	Tolima, Purificación	2015	KT211023
441200	Tolima, Armero-Guayabal	2015	KT211024
433676	Bolívar, Mahates	2014	KT211025
440252	Tolima, Armero-Guayabal	2015	KT211026
440417	Tolima, Guamo	2015	KT211028
440164	Tolima, Armero-Guayabal	2015	KT211029
439609	Huila, Neiva	2015	KT211030
439930	La Guajira, Barrancas	2015	KT211031
439933	La Guajira, Manaure	2015	KT211032
440324	Norte de Santander, Cúcuta	2015	KT211027
439690	Norte de Santander, Cúcuta	2015	KT211033
91-3	Arauca, Arauca	2014	KT211034
92-46	San Andrés, San Andrés	2014	KT211035
92-20	Magdalena, Santa Marta	2014	KT211036
91-8	Boyacá, San Luis de Gaceno	2014	KT211037
91-11	Boyacá, Soata	2014	KT211038
91-19	Cundinamarca, La Mesa	2014	KT211039
92-31	Magdalena, Santa Marta	2014	KT211040
93-44	La Guajira, Barrancas	2014	KT211041
986333	Guaviare, San José	2015	KT211042
433717	Bolívar, San Juan Nepomuceno	2014	KT211043
435088	Córdoba, Moñitos	2014	KT211044
435432	Cesar, Valledupar	2014	KT211045
434965	Sucre, Sincelajo	2014	KT211046
441578	Valle, La Unión	2015	KT211047
442892	Guainía, Puerto Inírida	2015	KT211048
442205	Chocó, El Cantón de San Pablo	2015	KT211049
441519	Valle, Cali	2015	KT211050
442891	Guainía, Puerto Inírida	2015	KT211051

Para cada virus se muestra el código interno, así como su procedencia geográfica (municipio y departamento), el mes y año de recolección y el número de registro en el Genbank.

el virus encontró una población completamente vulnerable ante la infección, sin historia de retos previos frente a este virus o cualquier otro estrechamente relacionado. Al igual que el virus Mayaro detectado en Colombia hace más de 50 años (28), el virus del chikungunya pertenece al complejo del virus del bosque de Semliki (29).

Otros alfavirus que han circulado en las últimas décadas en Colombia, como el virus de la encefalitis equina venezolana y el virus de la encefalitis equina del este, pertenecen a otros serocomplejos y su incidencia en el humano ha sido limitada a nivel geográfico (30), por lo que es improbable que confieran inmunidad cruzada frente al virus del chikungunya. En segundo lugar, el virus encontró una alta densidad y una amplia distribución del mosquito vector *A. aegypti* doméstico, lo cual le permitió completar su ciclo de transmisión de forma eficiente e invadir rápidamente los 33 departamentos, ocasionando un aumento exponencial de los casos de fiebre del chikungunya durante el 2014 y el primer semestre del 2015 (31,32).

A nivel filogenético, las secuencias de las cepas colombianas mostraron una estrecha relación con las secuencias de cepas de la Isla Saint Martin, de Islas Vírgenes y de las otras reportadas en la región de las Américas, las cuales pertenecen al genotipo de Asia, y cuya dinámica de dispersión espacial y temporal a través de las islas del Caribe, de Centroamérica y de Suramérica sugiere la presencia exclusiva de dicho genotipo en la región. Recientemente se reportó la presencia del genotipo ECSA en Brasil (17), sin embargo, su impacto a nivel epidemiológico solo podrá determinarse en la medida en que se conozcan los resultados de otros estudios moleculares realizados en los diversos países de la región.

A pesar de que se espera un incremento en la diversidad genética de las cepas que circulan en la región debido a las múltiples rondas de replicación y a la alta tasa de error reportada para este virus (15), la posibilidad de rastrear el origen reciente de las cepas que hayan ingresado y se hayan diseminado por el territorio nacional se ve limitada

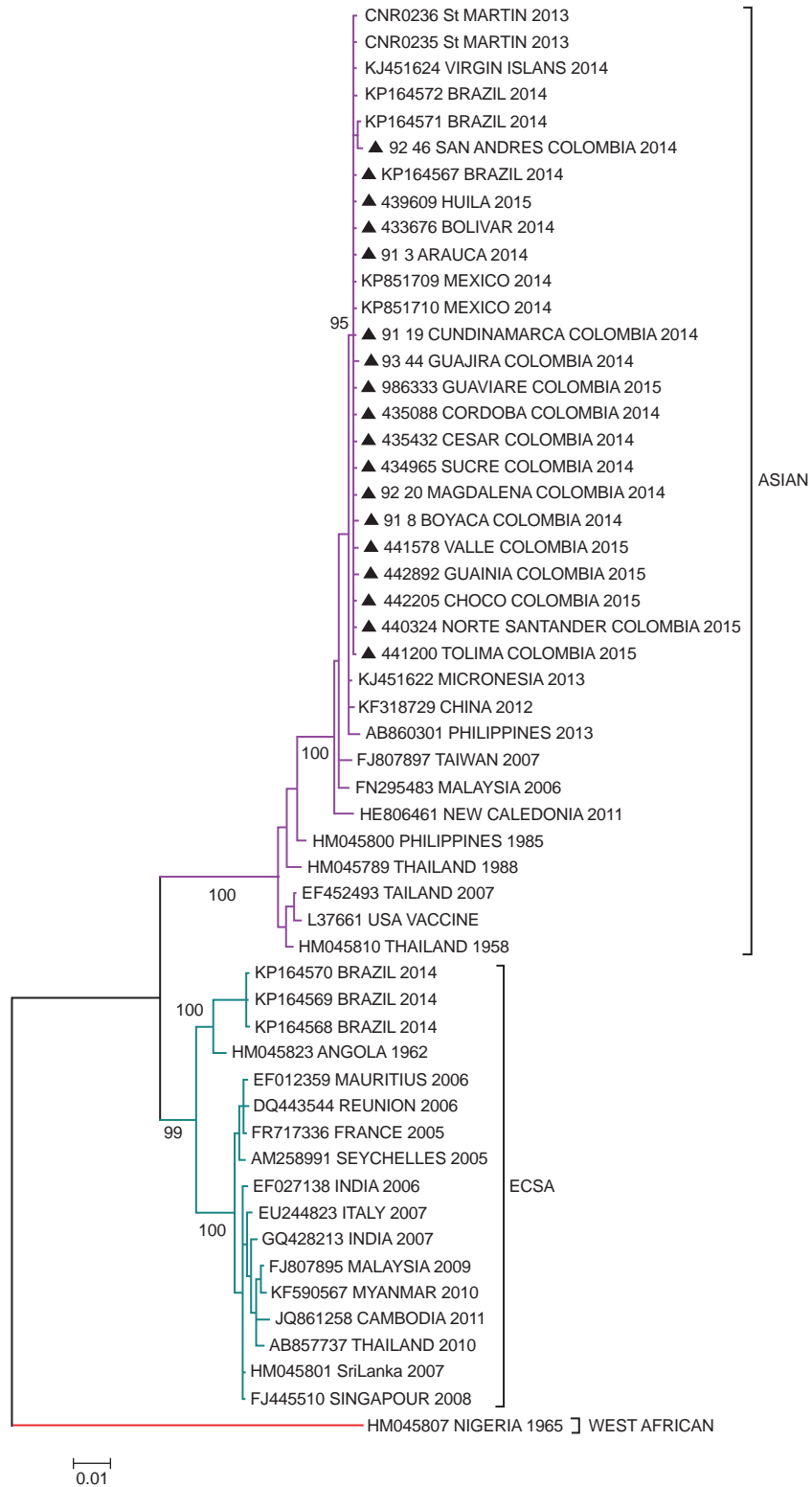


Figura 3. Filogenia del virus del chikungunya establecida mediante inferencia bayesiana con base en el gen *E1*. Se reconstruyó el árbol con el modelo de sustitución de nucleótidos GTR. Se muestran los valores de probabilidad posterior ≥ 90 . Como grupo externo se incluyó el genotipo WA por ser el más divergente en estudios previos. Los triángulos negros representan las cepas colombianas secuenciadas en el presente estudio. Teniendo en cuenta la alta identidad de las secuencias obtenidas, se incluyó una cepa por cada departamento.

Cuadro 3. Codones sujetos a selección negativa obtenidos por el método FEL

Codón	p<0,1	Codón	p<0,1	Codón	p<0,1	Codón	p<0,1
20	0,013	121	0,003	230	0,030	360	0,004
35	0,001	122	0,011	240	0,038	365	0,019
37	0,011	124	0,017	253	0,003	370	0,060
39	0,022	128	0,001	270	0,035	381	0,003
41	0,002	162	0,035	287	0,020	394	0,058
61	0,015	173	0,019	298	0,014	402	0,013
87	0,018	185	0,070	308	0,053	421	0,010
100	0,005	202	0,081	315	0,001	427	0,003
107	0,010	216	0,035	331	0,042	436	0,031

por el bajo número de secuencias genómicas del virus disponibles hasta la fecha y responsables de los brotes o epidemias en los países de la región (33,34), así como por la gran estabilidad del genotipo, reflejada en un alto porcentaje de identidad entre las secuencias de las cepas provenientes de diferentes países de la región.

En el análisis de evolución adaptativa, aunque los valores obtenidos por las pruebas de neutralidad a nivel global (longitud total) para la región genómica analizada sugieren la ausencia de selección natural, la relación entre los dN y los dS y un análisis más sólido de los codones mediante los métodos FEL, IFEL y SLAC, demostraron la existencia de una fuerte selección purificadora para el gen *E1*. La existencia de selección purificadora se sustenta en estudios con otros virus transmitidos por vectores artrópodos, en los cuales se ha demostrado la existencia de compromisos (*trade offs*) en su evolución, debido a que durante el ciclo de transmisión deben preservar la función proteica que les permita replicarse en dos huéspedes filogenéticamente distantes (artrópodo y vertebrado) (33,35). Estos compromisos, con un efecto directo en la eficacia biológica (*fitness* viral), comúnmente resultan en la eliminación de gran parte de la variabilidad a largo plazo y, por ende, en una mayor estabilidad genética, lo cual se ve reflejado en la poca acumulación de mutaciones en el gen *E1* de las cepas que circulan en las Américas, a pesar de haber alcanzado poblaciones de gran tamaño y ser responsable de múltiples brotes epidémicos.

Durante la epidemia de 2005 a 2006 ocasionada por el genotipo ECSA del virus del chikungunya en la isla La Reunión, se encontró la sustitución A226V localizada en la proteína E1 y se la relacionó con la capacidad del virus de infectar y replicarse en el vector *Aedes albopictus* (34,36,37); sin embargo,

esta sustitución no se ha encontrado en cepas pertenecientes al genotipo de Asia ni tampoco se evidenció en las secuencias colombianas analizadas. En el presente estudio la secuencia 93-44_Guajira_2014 presentó la sustitución de aminoácido T155I, la cual no se ha asociado al comportamiento epidemiológico o a la virulencia.

Considerando la presencia en el país de *A. aegypti* y de *A. albopictus* y la circulación simultánea de los genotipos de Asia y ECSA del virus del chikungunya en un país vecino (Brasil), es necesario establecer una vigilancia de genotipos, con el fin de detectar la potencial introducción de un nuevo genotipo, su interacción con el genotipo existente y su contribución a la transmisibilidad o virulencia del virus.

Se concluye que el patrón de dispersión del virus del chikungunya fue de alcance epidémico en Colombia, debido a la amplia distribución del vector *A. aegypti* y a la presencia de una población vulnerable ante la infección. Además, se identificó el genotipo de Asia como el único presente en la muestra de estudio, lo cual sugiere que ha sido el predominante, si no el único, durante la epidemia en el país. Asimismo, los patrones de diversidad genética y evolución adaptativa indican que el gen *E1* está sometido a una fuerte selección purificadora.

Los datos presentados en el presente manuscrito son los primeros sobre la caracterización genética del virus del chikungunya en Colombia, y su importancia para la salud pública es enorme, ya que nunca antes había habido transmisión de este virus en el país y, seguramente, la enfermedad se hará endémica. Por ello, es necesario continuar con la vigilancia de los genotipos del virus, con el fin de detectar posibles cambios en su epidemiología, su eficacia viral (*fitness*), su habilidad para colonizar nuevos vectores y su patogenicidad.

Agradecimientos

Los autores desean agradecer a las secretarías y laboratorios departamentales de salud pública por la recolección y el envío de las muestras al Grupo de Virología del Instituto Nacional de Salud. Igualmente, los autores desean agradecer a Martha González Pinilla del Grupo de Virología, por los aislamientos virales. J. A. Usme-Ciro fue beneficiario del Programa de Doctorados Nacionales de Colciencias.

Conflicto de intereses

Los autores manifiestan que no tienen conflicto de intereses con respecto al manuscrito.

Financiación

Este estudio fue financiado por la Dirección de Redes en Salud Pública del Instituto Nacional de Salud, Bogotá, D.C., Colombia.

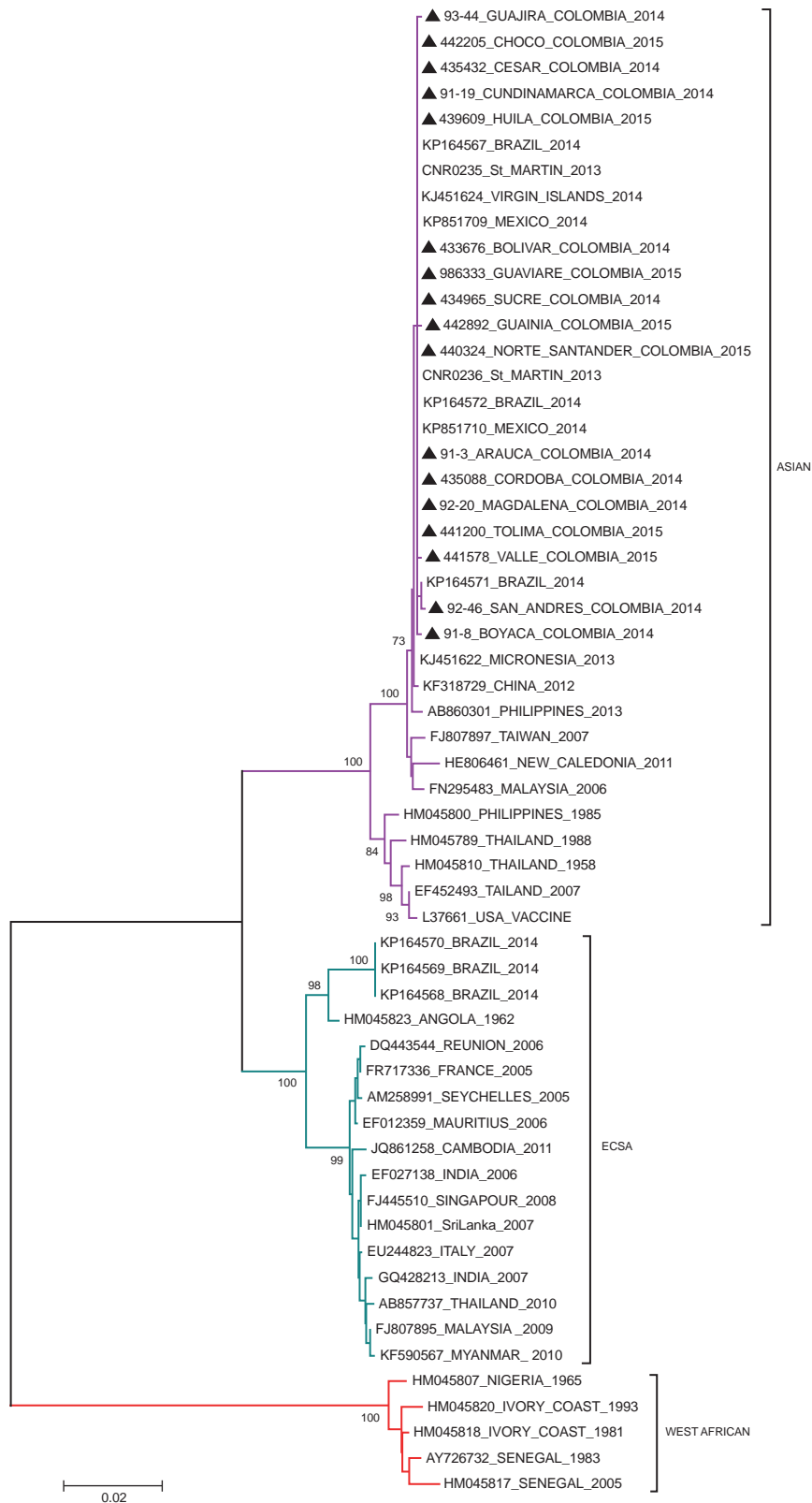
Referencias

- Powers AM.** Chikungunya. *Clin Lab Med.* 2010;30:209-19. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cll.2009.10.003>
- Knipe D, Howley P.** *Field's Virology.* Sixth edition. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2013. p. 651-86.
- Ross RW.** The Newala epidemic. III. The virus: Isolation, pathogenic properties and relationship to the epidemic. *J Hyg (Lond).* 1956;54:177-91.
- Dupuis-Maguiraga L, Noret M, Brun S, Le Grand R, Gras G, Roques P.** Chikungunya disease: Infection-associated markers from the acute to the chronic phase of arbovirus-induced arthralgia. *PLoS Negl Trop Dis.* 2012;6:e1446. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0001446>
- Rougeron V, Sam IC, Caron M, Nkoghe D, Leroy E, Roques P.** Chikungunya, a paradigm of neglected tropical disease that emerged to be a new health global risk. *J Clin Virol.* 2015;64:144-52. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcv.2014.08.032>
- Burt FJ, Rolph MS, Rulli NE, Mahalingam S, Heise MT.** Chikungunya: A re-emerging virus. *Lancet.* 2012;379:662-71. [http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736\(11\)60281-x](http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736(11)60281-x)
- Weaver SC.** Arrival of chikungunya virus in the new world: Prospects for spread and impact on public health. *PLoS Negl Trop Dis.* 2014;8:e2921. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0002921>
- Mowatt L, Jackson ST.** Chikungunya in the Caribbean: An epidemic in the making. *Infect Dis Ther.* 2014;3:63-8. <http://dx.doi.org/10.1007/s40121-014-0043-9>
- Morrison TE.** Reemergence of chikungunya virus. *J Virol.* 2014;88:11644-7. <http://dx.doi.org/10.1128/jvi.01432-14>
- Instituto Nacional de Salud.** Boletín epidemiológico semanal. Semana epidemiológica número 25 de 2015. Fecha de consulta: 15 de julio de 2015. Disponible en: <http://www.ins.gov.co/boletin-epidemiologico/Paginas/default.aspx>
- Lo Presti A, Lai A, Cella E, Zehender G, Ciccozzi M.** Chikungunya virus, epidemiology, clinics and phylogenesis: A review. *Asian Pac J Trop Med.* 2014;7:925-32. [http://dx.doi.org/10.1016/s1995-7645\(14\)60164-4](http://dx.doi.org/10.1016/s1995-7645(14)60164-4)
- Powers AM, Brault AC, Tesh RB, Weaver SC.** Re-emergence of Chikungunya and O'nyong-nyong viruses: Evidence for distinct geographical lineages and distant evolutionary relationships. *J Gen Virol.* 2000;81:471-9. <http://dx.doi.org/10.1099/0022-1317-81-2-471>
- Tsatsarkin KA, Chen R, Sherman MB, Weaver SC.** Chikungunya virus: Evolution and genetic determinants of emergence. *Curr Opin Virol.* 2011;1:310-7. <http://dx.doi.org/10.1016/j.coviro.2011.07.004>
- Volk SM, Chen R, Tsatsarkin KA, Adams AP, García TI, Sall AA, et al.** Genome-scale phylogenetic analyses of chikungunya virus reveal independent emergences of recent epidemics and various evolutionary rates. *J Virol.* 2010;84:6497-504. <http://dx.doi.org/10.1128/jvi.01603-09>
- Lo Presti A, Ciccozzi M, Cella E, Lai A, Simonetti FR, Galli M, et al.** Origin, evolution, and phylogeography of recent epidemic CHIKV strains. *Infect Genet Evol.* 2012;12:392-8. <http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2011.12.015>
- Leparc-Goffart I, Nougairède A, Cassadou S, Prat C, de Lamballerie X.** Chikungunya in the Americas. *Lancet.* 2014;383:514. [http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736\(14\)60185-9](http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736(14)60185-9)
- Nunes MR, Faria NR, de Vasconcelos JM, Golding N, Kraemer MU, de Oliveira LF, et al.** Emergence and potential for spread of Chikungunya virus in Brazil. *BMC Med.* 2015;13:102. <http://dx.doi.org/10.1186/s12916-015-0348-x>
- Lanciotti RS, Kosoy OL, Laven JJ, Panella AJ, Vézé JO, Lambert AJ, et al.** Chikungunya virus in US travelers returning from India, 2006. *Emerg Infect Dis.* 2007;13:764-7. <http://dx.doi.org/10.3201/eid1305.070015>
- Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, et al.** Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics.* 2007;23(21):2947-8. <http://dx.doi.org/10.1093/bioinformatics/btm404>
- Darriba D, Taboada GL, Doallo R, Posada D.** jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nat Methods.* 9. United States 2012. p. 772. <http://dx.doi.org/10.1038/nmeth.2109>
- Huelsenbeck JP, Ronquist F.** MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics.* 2001;17(8):754-5.
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipowski A, Kumar S.** MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Mol Biol Evol.* 2013;30(12):2725-9. <http://dx.doi.org/10.1093/molbev/mst197>
- Tajima F.** Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics.* 1989;123(3):585-95.
- Fu YX, Li WH.** Statistical tests of neutrality of mutations. *Genetics.* 1993;133(3):693-709.
- Librado P, Rozas J.** DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics.* 2009;25(11):1451-2. <http://dx.doi.org/10.1093/bioinformatics/btp187>
- Pond SL, Frost SD.** Datanmonkey: rapid detection of selective pressure on individual sites of codon alignments. *Bioinformatics.* 2005;21(10):2531-3. <http://dx.doi.org/10.1093/bioinformatics/bti320>
- Instituto Nacional de Salud.** IQEN Informe Quincenal Epidemiológico Nacional. Transmisión autóctona de Chikungunya en Colombia. 2014;19:311-38. Fecha de consulta: 6 de julio de 2015. Disponible en: <http://www.ins.gov.co/iqen/Paginas/default.aspx>
- Groot H.** Estudio sobre virus transmitidos por artrópodos en Colombia. *Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales.* 1964;12:197-217.
- Powers AM, Brault AC, Shirako Y, Strauss EG, Kang W, Strauss JH, et al.** Evolutionary relationships and systematics of the Alphaviruses. *J Virol.* 2001;75:10118-31. <http://dx.doi.org/10.1128/jvi.75.21.10118-10131.2001>
- Mesa F, Cárdenas J, Villamil L.** Las encefalitis equinas en la salud pública. Bogotá: UNAL; 2005. p. 1-124.

31. **Instituto Nacional de Salud.** Boletín epidemiológico semanal. Semana epidemiológica número 19 de 2015. Fecha de consulta: 15 de julio de 2015. Disponible en: <http://www.ins.gov.co/boletin-epidemiologico/Paginas/default.aspx>.
32. **Instituto Nacional de Salud.** Boletín epidemiológico semanal. 2014 - 2015. Fecha de consulta: 15 de julio de 2015. Disponible en: <http://www.ins.gov.co/boletin-epidemiologico/Paginas/default.aspx>.
33. **Weaver SC, Rico-Hesse R, Scott TW.** Genetic diversity and slow rates of evolution in New World alphaviruses. *Curr Top Microbiol Immunol.* 1992;176:99-117.
34. **Tsetsarkin KA, Vanlandingham DL, McGee CE, Higgs S.** A single mutation in chikungunya virus affects vector specificity and epidemic potential. *PLoS Pathog.* 2007;3:e201. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.0030201>
35. **Weaver SC, Brault AC, Kang W, Holland JJ.** Genetic and fitness changes accompanying adaptation of an arbovirus to vertebrate and invertebrate cells. *J Virol.* 1999;73:4316-26.
36. **Schuffenecker I, Itean I, Michault A, Murri S, Frangeul L, Vaney MC, et al.** Genome microevolution of chikungunya viruses causing the Indian Ocean outbreak. *PLoS Med.* 2006;3:e263. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pmed.0030263>
37. **Vazeille M, Moutailler S, Coudrier D, Rousseaux C, Khun H, Huerre M, et al.** Two Chikungunya isolates from the outbreak of La Réunion (Indian Ocean) exhibit different patterns of infection in the mosquito, *Aedes albopictus*. *PLoS One.* 2007;2:e1168. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0001168>



Archivo complementario 1. Inferencia filogenética por máxima verosimilitud del virus del chikungunya basada en el gen *E1*. Se reconstruyó el árbol mediante el método de ML con 1.000 réplicas *bootstrap* y el modelo de sustitución de nucleótidos GTR. El genotipo WA se utilizó como grupo externo solo con fines de visualización. Los triángulos negros representan las cepas colombianas secuenciadas en el presente estudio.



Archivo complementario 2. Inferencia filogenética del virus del chikungunya por *neighbor-joining* basada en el gen *E1*. Se utilizaron 1.000 réplicas *bootstrap* y el modelo de sustitución de nucleótidos Kimura 2. El genotipo WA se utilizó como grupo externo solo con fines de visualización. Los triángulos negros representan las cepas colombianas secuenciadas en el presente estudio.