

AÑO 2018
**ESTUDIO DEL VIRUS CHIKUNGUNYA: ANALISIS FILOGENOMICO,
VARIABILIDAD GENETICA Y POSIBLES RUTAS GEOGRAFICAS DE
INTRODUCCION A COLOMBIA**

Autor: Yeneiris Villeros Wolf

RESUMEN

El virus de Chikungunya (CHIKV) es un alfavirus que se transmite por mosquitos *Aedes aegypti* y causa una enfermedad febril acompañada de dolor articular severo. El CHIKV es considerado un problema de salud pública debido a su rápida propagación y alta morbilidad. Las mutaciones en el genoma del CHIKV han permitido que se adapte a diferentes entornos ecológicos y nuevos vectores. **Objetivo.** Analizar el virus *Chikungunya* desde la perspectiva filogenética, evolutiva y posibles rutas de introducción geográfica en Colombia. **Materiales y métodos.** Se realizó un estudio descriptivo de tipo retrospectivo a partir de 57 sueros humanos y 4 macerados de mosquitos positivos por qRT-PCR para CHIKV. Las muestras fueron recolectados en el año 2014 durante el brote de fiebre Chikungunya en Colombia y provenían de la región Caribe (Bolívar, Sucre, Córdoba) y región andina (Risaralda, Huila y Cauca). Para el aislamiento viral, 40 μ l de muestra fueron agregados a monocapas confluentes de células C6/36 y Vero. 16 aislados virales fueron seleccionados para amplificación y secuenciación del genoma. El ARN viral se extrajo de los sobrenadantes del cultivo usando QIAamp® Viral RNA Mini kit (QIAGEN®, Alemania). La síntesis de cDNA se realizó mediante primer random hexamers y M-MLV™ Reverse Transcriptase (Promega®). La amplificación se realizó mediante 12 juegos de iniciadores previamente reportados por Splaeford *et al*, que amplificaban desde el nucleótido 17 hasta el 11.993. Los amplicones se secuenciaron con Hi-seq2500® (illumina®). Los genomas se ensamblaron empleando el software Iterative Virus Assembler y los análisis filogenéticos se realizaron con BEAST™ versión 1.8.4. **Resultados.** Se lograron aislamientos virales en 54 de 57 (96,5%) de las muestras. El 65,4% (n=36/55) de los virus aislados provenían de Cartagena, 29% (n=16/55) de Ovejas, 1,8 % de Planeta Rica y 1, 8% de Mahates. No se logró aislar el virus a partir de mosquitos. Filogenéticamente el CHIKV se dividió en 3 genotipos: Africano occidental (WA), Este,

Central y Sur África (ECSA), y asiático (AS). El Africano occidental fue el genotipo más ancestral con un patrón de evolución y distribución geográfica limitada a África. El genotipo ECSA se dividió en tres clados: el primero agrupó cepas enzooticas que no se han detectado desde 1976; el segundo clado también agrupó cepas enzooticas que han circulado desde el año 1962 y fue detectado en Brasil en el año 2014 y el tercer clado agrupó las cepas que ocasionaron la epidemia del Océano Índico y la India. Respecto al genotipo asiático, se determinó que la ruta de expansión global inició con una cepa ancestral en Tailandia en 1958, que posteriormente llegó a Indonesia en el 2007, Filipinas entre 2011-2013 y finalmente en 2013-2014 alcanzó las Islas del Caribe y las Américas. El clado correspondiente a la epidemia en la Américas y el Caribe estuvo estrechamente relacionado con la cepa de Filipinas 2013 AB860301. Las secuencias Colombianas (16 de este estudio y 5 previamente publicadas en el Gen-Bank) se agruparon en el genotipo asiático pero en 3 subclados con cepas de orígenes geográficos distintos: i. la cepa panameña (KR559486) se relacionó con las del Caribe colombiano y Huila; ii. la cepa de Nicaragua (KY703969) fue cercana a Risaralda y Cauca iii. La cepa de St. Barts (KR559497) se relacionó con un CHIKV que circula posiblemente en Cundinamarca. Las cepas tuvieron mutaciones específicas que las diferenciaron de otras cepas asiáticas. Las mutaciones T-2139-C (nsP2-A153V) y C-2305-T fueron únicas para las cepas de Panamá, el Caribe colombiano y Huila. Las mutaciones T-3308-C (AA. nsP2-Y543H), G3840C (AA. nsP2-G720A) y T-5445-C (AA. nsP3-L458P) solo estuvieron presentes en las cepas de Nicaragua, Risaralda y Cauca. Las mutaciones A-5356-G, C-6676-T y G-7787-A (AA. C-R78Q) fueron únicas para St Barts y Cundinamarca. Se detectaron 40 sitios variables entre la cepa panameña (KR559486) y las provenientes del Caribe Colombiano Huila. Al comparar las cepas de Risaralda y Cauca con las de Nicaragua, se detectaron 18 polimorfismos; y en la de Saint Bart con Cundinamarca dos. **Conclusiones:** el CHIKV asiático que circula en las Américas se introdujo directamente desde Filipinas. El CHIKV Colombiano provino de tres sitios geográficos diferentes: Panamá, Nicaragua y St. Barts. Las cepas que circulan en Colombia, Panamá, Nicaragua y Saint Barts tienen mutaciones sinónimas y no sinónimas que las diferencian de otras a nivel mundial. El CHIKV adquirió polimorfismos durante el brote en Colombia, posiblemente asociados con adaptación a

vectores o un aumento de la patogenicidad viral. Los hallazgos son importantes para entender la dinámica de transmisión y biología del CHIKV en Colombia y las Américas.

Palabras clave: arbovirus, alfavirus, epidemiología molecular, salud pública.

ABSTRACT

Chikungunya virus (CHIKV) is an alpha virus that is transmitted by *Aedes aegypti* mosquitoes and causes a febrile illness accompanied by severe joint pain. CHIKV is considered a public health problem due to its rapid spread and high morbidity. Mutations in the CHIKV genome have allowed it to adapt to different ecological environments and new vectors. **Objective.** Analyze the Chikungunya virus from the phylogenetic, evolutionary perspective and possible geographical introduction routes in Colombia. **Materials and methods.** A retrospective descriptive study was conducted from 57 human sera and 4 macerated positive mosquitoes by qRT-PCR for CHIKV. The samples were collected in 2014 during the outbreak of Chikungunya fever in Colombia, samples were from the Caribbean region (Bolívar, Sucre, Córdoba) and the Andean region (Risaralda, Huila and Cauca). For viral isolation, 40 ul of sample were added to confluent monolayers of C6 / 36 and Vero cells. 16 viral isolates were selected for amplification and genome sequencing. Viral RNA was extracted from the culture supernatants using QIAamp® Viral RNA Mini kit (QIAGEN®, Germany). The synthesis of cDNA was performed by first random hexamers and M-MLV™ Reverse Transcriptase (Promega®). Amplification was carried out using 12 sets of primers previously reported by Splaeford et al, which amplified from nucleotide 17 to 11,993. The amplicons were sequenced with Hi-seq2500® (illumina®). The genomes were assembled using the Iterative Virus Assembler software and the phylogenetic analyzes were performed with BEAST™ version 1.8.4. **Results.** Viral isolations were achieved in 54 of 57 (96.5%) of the samples. 65.4% (n = 36/55) of the isolated viruses came from Cartagena, 29% (n = 16/55) from Ovejas, 1.8% from Planeta Rica and 1.8% from Mahates. It was not possible to isolate the virus from mosquitoes. Phylogenetically the CHIKV was divided into 3 genotypes: Western African (WA), Eastern, Central and South Africa (ECSA), and Asian (AS). Western Africa was the most ancestral genotype with a pattern of evolution and geographical distribution limited to Africa. The ECSA genotype was divided into three clades: the first group of enzootic

strains that have not been detected since 1976; the second clade also grouped enzootic strains that have circulated since 1962 and was detected in Brazil in 2014 and the third clade grouped the strains that caused the epidemic of the Indian Ocean and India. Regarding the Asian genotype, it was determined that the global expansion route began with an ancestral strain in Thailand in 1958, which subsequently arrived in Indonesia in 2007, the Philippines between 2011-2013 and finally in 2013-2014 reached the Caribbean Islands and the Americas. The clade corresponding to the epidemic in the Americas and the Caribbean was closely related to the Philippine strain 2013 AB860301. The Colombian sequences (16 of this study and 5 previously published in the Gen-Bank) were grouped in the Asian genotype but in 3 subclades with strains of different geographical origins: i. the Panamanian strain (KR559486) was related to those of the Colombian Caribbean and Huila; ii. the strain of Nicaragua (KY703969) was close to Risaralda and Cauca iii. The strain of St. Barts (KR559497) was related to a CHIKV possibly circulating in Cundinamarca. The strains had specific mutations that differentiated them from other Asian strains. The mutations T-2139-C (nsP2-A153V) and C-2305-T were unique for the strains of Panama, the Colombian Caribbean and Huila. The mutations T-3308-C (AA, nsP2-Y543H), G3840C (AA, nsP2-G720A) and T-5445-C (AA, nsP3-L458P) were only present in the strains of Nicaragua, Risaralda and Cauca. The mutations A-5356-G, C-6676-T and G-7787-A (AA.C-R78Q) were unique for St Barts and Cundinamarca. We detected 40 variable sites between the Panamanian strain (KR559486) and those from the Colombian Caribbean Huila. When comparing the Risaralda and Cauca strains with those from Nicaragua, 18 polymorphisms were detected; and in the one of Saint Bart with Cundinamarca two. **Conclusions:** Asian CHIKV circulating in the Americas was introduced directly from the Philippines. The Colombian CHIKV came from three different geographic locations: Panama, Nicaragua and St. Barts. The strains that circulate in Colombia, Panama, Nicaragua and Saint Barts have synonymous and non-synonymous mutations that differentiate them from others worldwide. CHIKV acquired polymorphisms during the outbreak in Colombia, possibly associated with adaptation to vectors or an increase in viral pathogenicity. The findings are important to understand the dynamics of transmission and biology of CHIKV in Colombia and the Americas.

Key words: arbovirus, alphavirus, molecular epidemiology, public health.