ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL

Facultad de Ciencias de la Vida

"APLICACIÓN DE MÉTODOS EPIDEMIOLÓGICOS Y FILOGENÉTICOS EN EL ESTUDIO DEL VIRUS DEL DENGUE EN EL ECUADOR: 2009-2014"

INFORME DE PROYECTO INTEGRADOR

Previa a la obtención del Título de:

BIOLOGO

Amaya Montesdeoca Luis Andrés

Y

Rivas Medrano Suamy Melissa

GUAYAQUIL – ECUADOR

AÑO: 2018

AGRADECIMIENTOS

Luis Andrés Amaya Montesdeoca

En el transcurso de mi vida y mi formación profesional se han logrado grandes éxitos y le hago responsable a Jehová Dios por dicha bendición.

Agradezco a mi futura esposa Carla S. Hernández B. por su incondicional apoyo en la mejor parte de mi trayectoria profesional y espiritual; a mis padres Luis E. Amaya P. y Malli T. Amaya M. por sus grandes consejos en continuar con mi pasión por la ciencia; a mis profesores de ESPOL, ya que todos juntos lograron de mi un futuro científico honesto y responsable.

Suamy Melissa Rivas Medrano

Agradezco a mi familia, en especial a mi madre María Isabel Medrano por ser mi pilar, mi fuerza, mi modelo a seguir, por brindarme siempre su apoyo incondicional, y por supuesto, mucho amor. A mis compañeros, amigos y futuros colegas por todos los momentos agradables y experiencias vividas a lo largo de estos años. Y a mi novio Roberto Antón por sus palabras de aliento y por motivarme a ser mejor cada día

DEDICATORIA

Luis Andrés Amaya Montesdeoca

El presente proyecto lo dedico a todos quienes fueron parte fundamental para poder llevar a cabo la investigación propuesta con beneficio a nivel nacional para la correspondiente intervención y prevención de futuros casos de muerte por dengue.

Entre ellos: MSc. Cesar Bedoya (tutor-ESPOL), Dra. Regato Mary (Cotutora-INSPI) y Dra. Mercy Borbor(ESPOL).

Suamy Melissa Rivas Medrano

A la memoria de mi tío Luis Medrano Muñoz, siempre presente en mi corazón.

EVALUADOR DEL PROYECTO

MSc. Cesar Humberto Bedoya Pilozo

Tutor Proyecto Integrador

MSc. Diego Arturo Gallardo Polit

Profesor Materia Integradora

Dra. Mary Ernestina Regato Arrata

Co-tutora Proyecto Integrador

DECLARACIÓN EXPRESA

"La responsabilidad y la autoría del contenido de este Trabajo de Titulación, nos corresponde exclusivamente; y damos nuestro consentimiento para que la ESPOL realice la comunicación pública de la obra por cualquier medio con el fin de promover la consulta, difusión y uso público de la producción intelectual"

Amaya Montesdeoca Luis Andrés

Rivas Medrano Suamy Melissa

RESUMEN

Se realizó un análisis retrospectivo de las infecciones del dengue y un análisis de filogenia del virus con cepas aisladas de muestras clínicas en Ecuador. El objetivo del estudio fue asociar la presencia de los genotipos circulantes de cada serotipo con los casos epidemiológicos reportados, mediante métodos bayesianos de evolución molecular y de estadística inferencial y descriptiva. Se consideraron también factores climáticos y grupos de riesgo. Para la parte epidemiológica se realizó una recopilación de las bases de datos del MSP y del INHAMI con el fin de registrar los datos de número de casos de dengue por provincias y los datos de temperatura media y precipitaciones anuales. Se realizó mediante el software statgraphics Centurion un análisis de varianza y correlación entre los factores climáticos y los casos reportados de dengue anualmente donde sólo la temperatura resultó estadísticamente significativa.

El análisis filogenético del virus del dengue realizado con cepas de Ecuador (2009-2014) muestra que ha circulado un genotipo por cada serotipo. Siendo el genotipo Americano/Africano del Denv-1 el de mayor variación genética y el más relacionados con los brotes epidemiológicos (2009,2010 y 2012) registrado en varios provincias (Esmeraldas, Los Ríos y Orellana) de donde surgen aparentes nuevos sublinajes. Una cepa aislada en Manta del genotipo Americano/Asiático del Denv-2, se muestra una posible relación con un gran brote de dengue clásico y hemorrágico jamás reportado en el país, dado en el 2012, ya que diverge del resto de cepas aisladas en Ecuador. Para el caso del DENV-3 las cepas de Ecuador se alinearon dentro del clado del genotipo III y no se vincula con brotes epidemiológicos en nuestro periodo de estudio. El genotipo II del DENV-4 no ha sido reportado con relación a casos fatales del dengue en Latinoamérica, sin embargo, en el Ecuador, este genotipo circulo antes, durante y después de un brote epidemiológico.

ÍNDICE GENERAL

AGRADECIMIENTOS iii
DEDICATORIA v
EVALUADOR DEL PROYECTO vii
DECLARACIÓN EXPRESA viii
RESUMEN ix
ÍNDICE GENERAL 10
ABREVIATURA 12
ÍNDICE DE FIGURA 13
ÍNDICE DE ANEXOS 15
INTRODUCCIÓN 16
JUSTIFICACIÓN DEL ABORDAJE DEL TEMA 16
CAPÍTULO 1 22
1. EPIDEMIOLÓGICA Y FILOGENÉTICA EN ECUADOR 22
1.2 Antecedentes 22
1.2.1 Situación en América 22
1.2.2 Situación en Ecuador 24
CAPÍTULO 2 26
2. DATOS EPIDEMIOLÓGICAS Y RECONSTRUCCIÓN DE ÁRBOLES FILOGENÉTICOS 26
2.1. Epidemiologia 26
2.2. Secuencias virales y reconstrucción de árboles filogenéticos 27
2.2.1. Cepas virales del Dengue serotipo 1 28
2.2.2. Cepas virales del Dengue serotipo 2 29
2.2.3. Cepas virales del Dengue serotipo 3 29
2.2.4. Cepas virales del Dengue serotipo 4 30
CAPÍTULO 3 31
3. FACTORES INFLUYENTES DEL DENGUE, CASOS REPORTADOS Y DESCRIPCION DE GENOTIPAJE CIRCULANTES 31

3.1. Edad y Sexo 31
3.3 Factores climáticos 33
3.4 Casos reportados 34
3.5. Circulación de serotipos y su respectiva dominancia en los años de análisis. 37
3.6. Distribución serotípica y genotípica del virus dengue en el Ecuador 38
3.7 Arboles filogenéticos de los cuatro serotipos del DENV. 40
3.7.1 Dengue Serotipo 1 (DENV-1) 40
3.7.2 Dengue Serotipo 2 (DENV-2) 45
3.7.3 Dengue Serotipo 3 (DENV-3) 49
3.7.4 Dengue Serotipo 4 (DENV-4) 51
Discusiones 55
4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES 57
BIBLIOGRAFÍA 59
ANEXOS 65
Factor temperatura 65
Factor Precipitación 66

ABREVIATURA

Am/As: Americano/Asiático

Am/Af: Americano/Africano

BEAST: Análisis evolutivo bayesiano mediante el muestreo de árboles

BLAST: herramienta básica de alineamiento local

BS: Bayesian Skyline

CprM-Region: Región de la capside y precursora de membrana

DEN: Dengue

DENV: Virus del dengue

DENV1-4: Dengue serotipo 1-4

DHF: Dengue hemorrágico

DPH: intervalos de densidad de probabilidad

E-region: Región de Envoltura del dengue

GTR: General Time Reversible (Tiempo general reversible)

G+I: Distribución Gamma e Intervalos

MCMC: Método se algoritmos de cadena de Markov de Monte Carlo

MEGA: Análisis Genético Evolucionario Molecular

NCBI: Centro Nacional de Información biotecnológico

NJ: Neighbor Joining

INSPI: Instituto Nacional de Investigación en Salud Publica

LogN: Logaritmo Distribución Normal

TN+2: Taruma Nei 2 parametros

ÍNDICE DE TABLA

Tabla 1: Distribución mundial de los genotipos por serotipos del virus del dengue (DENV). 19
Tabla 2. Resumen de países afectados por dengue en la década 2000 a 2010 23
Tabla 3. Presencia de serotipos de dengue en países de Sudamérica, años 2009 a 2014.. 24
Tabla 4. Números de secuencias de nucleótidos del virus de dengue detectados en pacientes a nivel nacional y analizados en el presente estudio. Periodo: 2009-2014. 27
Tabla 5. Frecuencias de edad y género de pacientes cuyas cepas virales de dengue fueron analizados en este estudio. 31
Tabla 6. Registros de dengue hemorrágico y mortalidad desde el año 2002 hasta el 2016 35
Tabla 7. Años, serotipos, dominancia y número de casos de dengue clásico y hemorrágico 37
Tabla 8. Información de pacientes cuyas secuencias virales aisladas divergen del resto de sublinajes (caracterizados en GenBank) del genotipo Am/Af. ... 45
Tabla 9. Información de pacientes cuyas secuencias virales originan la nueva divergencia en el genotipo Am/As al resto de Sudamérica 49
Tabla 10.Temperaturas medias de todas las provincias durante los años 2009 a 2012. 65
Tabla 11. Precipitaciones de todas las provincias durante los años 2009 a 2012 66

ÍNDICE DE FIGURA

1.Figura 3.2.1: Mapas del Ecuador mostrando las provincias más afectadas por dengue durante los años 2009-2014 según MSP 32
2.Figura 3.7.1.1[a] Distribución de secuencias basados en la región CprM del virus del dengue. 40
3 Figura 3.7.1.1[b] Árbol filogenético usando la región CprM..... 41
4.Figura 3.7.1.2[a] Árbol filogenético construido mediante de Test de Neighbor-Joining con un numero de 1000 replicaciones, con un modelo se sustitución de Kimura 2-parameters y un tratamiento de datos de eliminación por pares. .. 42
5.Figura 3.7.1.2[b] Árbol filogenético de Máxima Verosimilitud construido mediante el editor gráfico de alineación de secuencia múltiples SEAVIEW usando PhyML.. 43
6.Figura 3.7.1.2[c] Árbol filogenético construido con alineamiento de la región E, en disposición radial confirma la divergencia para ciertas cepas ecuatorianas (2009-2013) distintos a las cepas caracterizada como sublinaje A, B y C del mismo genotipo V (Am/Af). 44
7.Figura 3.7.2.1 Árbol filogenético de Máxima Verosimilitud con cepas DENV-2 CprM, alineamiento realizado en MEGA7 con método de ClustalW, modelo de sustitución GTR+G4+I. 30 millones de generaciones.. 47
8.Figura 3.7.2.2. Árbol filogenético de Máxima Verosimilitud construido mediante el editor gráfico de alineación de secuencia múltiples SEAVIEW usando PhyML. Modelo de sustitución GTR con una tasa de variación por sitio de categoría 4 y con un número de 1000 replicaciones 48
9.Figura 3.7.3.1 Árbol filogenético construido mediante de Test de Neighbor-Joining con un numero de 1000 replicaciones 50
10.Figura 3.7.3.2 Árbol filogenético de Máxima Verosimilitud con cepas DENV-3 con región E; alineamiento realizado en MEGA7 con método de ClustalW, modelo de sustitución GTR+G4+I y un modelo estricto de reloj molecular..... 51
11.Figura 3.7.4.1 Árbol filogenético de Máxima Verosimilitud con cepas DENV-4 con región CprM; alineamiento con método de ClustalW, modelo de sustitución GTR+G10+I y un modelo relajado no correlacionado exponencial (uced) para el reloj molecular y con una previa distribución expotencial..... 53
12.Figura 3.7.4.2 Árbol filogenético de Máxima Verosimilitud con cepas DENV-4 con región E. 54

ÍNDICE DE GRÁFICOS

1.Gráfico 3.3.1 Modelo ajustado de los casos de dengue por año y Temperatura ºC. 34
2.Gráfico 3.3.2 Promedios de temperatura anual por provincias en los años 2009 a 2012 34
3.Gráfico 3.4.1 Casos totales reportados de dengue y DHF en Ecuador años 2002-2016 35
4.Gráfico 3.4.2 Casos de DHF años 2002 a 2016 36
5.Gráfico 3.4.3 Casos totales de dengue Y DHF reportados años 2002 a 2016 37
6.Gráfico 3.6. Porcentajes de pacientes analizados en el presente estudio con sus respectivos serotipos de dengue detectados en clínicamente. 38

INTRODUCCIÓN

SITUACIÓN DEL PROBLEMA

Hay poca información sobre la situación clínica-epidemiológica de los serotipos de dengue circulantes del año 2009 a 2014 en el Ecuador.

JUSTIFICACIÓN DEL ABORDAJE DEL TEMA

Hace 50 años el total de países que habían padecido una epidemia de dengue (DEN) eran apenas nueve, en la actualidad, es una enfermedad endémica en más de 100 países a nivel mundial[1][2]. El virus del dengue (DENV) ha infectado a 400 millones de personas aproximadamente cada año. En particular, en la región de América se vió afectada con 235 millones de casos en el 2015, de los cuales más de mil provocaron víctimas mortales.

El dengue es hoy en día una de las enfermedades infecciosas de mayor preocupación a nivel mundial, ya que, tiene una incidencia anual de 390 millones de afectados virales [3]: además, es la enfermedad transmitida por vectores que más rápido se propaga (Aedes aegypti y Aedes. albopictus) y su distribución en ambientes urbanos y peri-urbanos ponen cerca de una tercera parta de la población humana en riesgo de infección [4][5].

En el Ecuador hubo más casos de dengue hemorrágico (DHF por sus siglas en inglés) a partir del 2005 con un brote epidémico en ese mismo año y en 2007, luego en 2010, donde hubo más casos que los anteriormente reportados. En esa ocasión se registran más de 300 casos siendo las provincias costeras las más afectadas, en especial la provincia de El Oro con una tasa de DEN del 19.51%.[6]

Con la aplicación de métodos de estudios epidemiológicos y la reconstrucción filogenética de secuencias provenientes de muestras clínicas en una misma escala espacio-temporal, podremos describir la existencia de una correlación entre los serotipos y genotipos circulantes en el país junto con las manifestaciones graves de esta enfermedad; todo esto con el fin de vigilar y detectar a tiempo las posibles infecciones futuras que causan la muerte.

MARCO TEÓRICO

Los virus con genoma de ARN posee una rápida evolución causada: primero por las altas tasas de mutaciones, ya que, cometen al menos un error por cada replicación; segundo por su tiempos cortos de generación que produce varias progenies cada día y tercero, por su inmenso tamaño poblacional [7] lo que conlleva a tener una rápida tasa de sustitución de nucleótidos, en promedio de seis ordenes en magnitud que las eucariotas y virus de ADN [8]. La tasa de sustitución de nucleótidos son importantes para los procesos epidemiológicos, ya que, en una misma escala de tiempo pueden presentarse una diversidad, cuyas mutaciones se fijan en las poblaciones virales [9]; el dengue es un virus que posee estas características.

El genoma de ARN sentido positivo del DENV contiene aproximadamente 11k bp (11 mil pares de bases) de ARN lineal, traducida como poliproteína única y dividida en 10 componentes proteicos [10] de las cuales se produce tres proteínas estructurales(Envoltura, E; precursora de membrana, prM y cápside, C) y siete proteínas no estructurales (NS), (NS1-NS5)[11]. El DENV pertenece al género Flavivirus, familia Flavoviviridae y se distingue por poseer 4 serotipos antigenéticos, denominados DENV-1, DENV-2, DENV-3 y DENV-4 [12] hasta se ha anunciado un quinto serotipo (DENV-5)[13] aunque la razón exacta de su aparición no está clara. Cada serotipo posee genotipos que surgen que se origen de diferentes partes del mundo como vemos en la *tabla 1*. Existen también sublinajes de cada uno de estos genotipos que se presentan en varias regiones como en el caso de Brasil [14] que está muy bien caracterizado 4 sublinajes del genotipo V (Americano/Áfricano) y que han desplazados a otras sublinajes durante una circulación en este territorio brasileño. La infección provocada por uno de estos serotipos en específico, produce inmunidad contra dicho serotipo y cuando esta inmunidad disminuye parece aumentar el riesgo de enfermedad graves en infección con otros serotipos posteriores, después de un periodo de protección cruzada[15].

Otro rasgo de estas infecciones, es que se encuentran clasificadas por niveles de severidad desde infecciones asintomáticas hasta dengue (DF), una enfermedad con síntomas auto limitada, hasta el dengue grave y potencialmente mortal que se manifiesta con fiebre hemorrágica (DHF) y síndrome de shock (DSS) [16]. La DHF se manifiesta de 4 maneras: fiebre alta, fenómenos hemorrágicos, hepatomegalia y en casos graves, se pueden presentar signos de circulación sanguínea insuficiente. Se puede desarrollar, además, un shock hipovolémico como resultado de una fuga de plasma (DSS) [17]. El riesgo de desarrollar DHF es mayor aún si una persona es infectada con dos serotipos diferentes, y aunque técnicamente una persona podría padecer los cuatro serotipos de DEN a lo largo de su vida, hasta ahora solo se han identificado hasta 3 serotipos en el mismo individuo.[18]

Todos los serotipos han sido aislados en América y demás países de la región tropical donde principalmente es endémico el DENV debido a ciertos factores que favorecen su contagio: densidad poblacional alta y muchos sitios de reproducción del vector [19]. En la actualidad, los cuatro serotipos del DENV se encuentran en casi todos los ambientes peri-urbanos y urbanos dentro de las zonas subtropicales y tropicales. Así, el DENV se ha convertido en endémico en más de 100 países [2]. En varios países los serotipos circulan al mismo tiempo, lo que crea un gran riesgo de formarse una epidemia. Lo más complejo de esto, es que todos los serotipos son potencialmente capaces de producir la forma grave del dengue o DFH, aunque, son los serotipos 2 y 3 los que han sido vinculados más veces a casos graves y muertes.[18]

Las variaciones genéticas del serotipo 1 (DENV-1) consiste en 6 genotipos (I, II, III, IV, V y selvático); el serotipo 2 (Denv-2) consiste en genotipo americano, asiático 1, asiático 2, asiático/americano, cosmopolitan y selvático. Mientras que en los serotipos 3 y 4 consiste 5 genotipos: I, II, III, IV y selvático [20]. Sus orígenes son diferentes, tal y como se muestra en la tabla 1 a continuación:

Serotipo	Genotipos endémicos*	País de origen	Referencias
DENV-1	I	Sudeste Asiático, China, Este de África	[21][19]
	II	Tailandia	
	III	Cepas Selváticas aisladas en Malasia	
	IV	Islas del oeste del Pacifico y Australia	
	V	América, Oeste de África y Asiáticos	
DENV-2	Americano	América Latina, Caribe, India e Islas del Pacifico	[20]
	Asiático I	Malasia y Tailandia	
	Asiático II	Vietnam, China, Taiwán, Sri Lanka y Filipinas	
	Americano/Asiático	Tailandia, Vietnam, América	
	Cosmopolitan	Distribución amplia	
DENV-3	I	Indonesia, Malasia, Filipinas, Islas del Pacifico	[24][25]
	II	Tailandia, Vietnam, Bangladesh	
	III	Sri Lanka, África, India, Samoa	
	IV	Puerto Rico, América Central, América Latina, Tahití	
DENV-4	I	Tailandia, Sri Lanka, Filipinas, Japón	[26]
	II	Indonesia, Malasia, Tahití, Caribe, América	
	III	Tailandia	
	IV	Selvático	

Tabla 1: Distribución mundial de los genotipos por serotipos del virus del dengue (DENV). **Cada serotipo posee, además, genotipos selváticos que posee otros tipo de ciclo de transmisión que no incluye a los humanos[27].**

El dengue (DEN) es una enfermedad viral, sistémica y dinámica[19], posee vectores, como la hembra del mosquito *Aedes aegypti* [17] que se distribuye desde el sur de EE.U.U. a lo largo de centro américa y Sudamérica, pasando por el caribe países como Cuba en donde también se han reportado epidemias de DEN desde el año 1977.[28]

Los casos de DEN, a partir del 2010 aumentaron en 3 regiones de los Estados miembros de la OMS, es así que en el año 2015 pasaron de 2.2 a 3.2 millones reportados anualmente [29]. Más alarmante es que según las estimaciones recientes se producen 390 millones casos de DEN por año a nivel mundial, y de estos, 96 millones tienen manifestaciones clínicas.[30]

Históricamente ha habido epidemias de DEN desde el siglo XVI, las islas Martinica y Guadalupe son las primeras en aparecer en esta línea del tiempo con un registro

en el año 1635. Más de un siglo después, en el año 1780, se describió un amplio brote en Pensilvania, Estados Unidos. En 1827 sucede el primer brote en varios países: E.E.U.U., Jamaica, Cuba y Venezuela fueron afectados. Panamá, Puerto Rico, Chile y el Norte de Argentina son afectados por otra epidemia al inicio del siglo pasado, en 1912.[31]

Luego de la segunda guerra mundial, en 1945, empezaron a circular los 4 serotipos del DENV alrededor del trópico asiático y el resto del mundo [32]. Desde 1995 más de 40 países empezaron a reportar casos de serotipos que circulan al mismo tiempo; por eso, en 2010 se crea un mapa de las zonas de riesgo de transmisión del DEN.[33] En éste, se muestra que no solo es el trópico asiático el que presenta alto riesgo sino toda la línea tropical y subtropical con mayor pronunciamiento en Sudamérica.

Entre los países más afectados se encuentra Brasil que ha llegado a acumular hasta el 70% del total de los casos de DEN en todo el continente[34]. En toda América existe una tendencia de brotes epidémicos que se suscitan cada 3 a 5 años [35] y la enfermedad que se extienden a nuevas áreas donde los brotes se producen en poblaciones no preparados inmunológicamente[36][37], es decir que no presentan inmunidad contra ningún serotipo. Las razones pueden ser varias: acumulación de factores de riesgo, más de un serotipo circulante, asociación de ambos, etc.

Dicho esto, en el año 2010 parece haber ocurrido un pico de DEN no solo a nivel nacional, sino a nivel de toda América; Brasil, Colombia, Venezuela y Honduras fueron también afectados con mayor número de casos de dengue y dengue grave.

Por todo lo anteriormente mencionado, es importante que haya más estudios relacionados a los serotipos de DENV y su epidemiología en nuestro país. A nivel nacional aún no se ha realizado investigaciones que identifique la relacione epidemiológica con los serotipos de DENV circulantes; es por eso por lo que hemos decidido realizar esta investigación con el fin de que sea de mucha utilidad para proyectos futuros con la prevención de epidemias de enfermedad letales como el dengue grave (DHF y DSS).

DECLARACIÓN DE OBJETIVOS:

- GENERAL

  Analizar la epidemiologia y filogenia molecular del dengue en el Ecuador desde 2009 al 2014 mediante la aplicación de métodos epidemiológicos y de reconstrucción de árboles filogenéticos.

- ESPECÍFICOS

  Identificar los genotipos de cada serotipo del virus del dengue circulante en Ecuador en el periodo del 2009 al 2014 mediante análisis filogenético de suplemento de máxima verosimilitud y su evolución mediante un análisis genético evolucionario molecular bayesiano.

  Aplicar métodos estadísticos de análisis de varianza y correlación, mediante el software Statgraphics centurion para determinar la posible influencia de factores climáticos sobre los casos de dengue reportados.

  Asociar la presencia de los genotipos circulantes de cada serotipo en el Ecuador con los casos epidemiológicos reportados.

CAPÍTULO 1

INFORMACIÓN GENERAL

1. EPIDEMIOLÓGICA Y FILOGENÉTICA EN ECUADOR

1.1 Importancia de los estudios de Epidemiología

Conocer los componentes de distribución y frecuencia de las enfermedades de interés en Salud pública es necesario para predecir y proyectar su comportamiento; de esta manera se puede establecer estrategias de prevención y control en su propagación hacia poblaciones y comunidades.[38]

1.2 Antecedentes

Después de la segunda guerra mundial hubo un aumento exponencial de la distribución geográfica de los cuatro serotipos del dengue; esto fue dado gracias al movimiento facilitado y rápido entre las poblaciones por medio de transportes aéreos, la falta de gestión de residuos y de agua alcantarillado en países con extensas zonas rurales, así como los insostenibles programas de control de vectores[32]. Sin embargo, conociendo lo reportado anteriormente, no solo estos factores involucran en los brotes epidemiológicos, si no que se direccionan hacia unos serotipos. Se había mencionado que los serotipos 2 y 3 del DENV han sido vinculados más veces a casos de dengue grave y víctimas mortales, sin embargo, en nuestro país no se ha especificado ningún tipo de vinculación de loa brotes epidemiológicas del dengue clásico con la distribución de los 4 serotipos que ha circulado, de modo particular, en el Ecuador en comparación el resto de países de Sudamérica (*Nótese la Tabla3*).

1.2.1 Situación en América

Aunque ha habido epidemias de DEN desde siglos pasados, en el año 80 se reportó la primera epidemia de DHF en el continente; se registró en el año 1981 en Cuba, causada por el DENV-2[28]. Luego dos países padecieron en 1990:

Venezuela y Perú[39], para ese entonces ya se podía notar que la enfermedad y su forma grave (DH) no eran solo un problema del continente asiático. En 1991 Brasil reportó una epidemia de dengue clásico y hemorrágico (DSS y DHF), solo 6 años después, en 1997 Cuba padece otra epidemia de DHF [40]. Desde entonces las epidemias de DENV en América parecen venir en mayor número y con más fuerza, sobretodo en la
década de 2000-2010[41] tal y como se muestra en la siguiente tabla:

Año	Países
2000	Ecuador, Paraguay
2001	Perú
2002	Brote Panamericano
	Honduras, Brasil, Trinidad y Tobago, Costa Rica El Salvador, República Dominicana, Nicaragua
	Cuba, Venezuela y Colombia los más afectados
2005	Costa Rica
2006	Paraguay
2007	Paraguay, Brasil
2008	Brasil
2009	Bolivia, Argentina, México, Nicaragua
2010	Brote Panamericano
	Venezuela, Brasil y Colombia los más afectados

Tabla 2. Resumen de países afectados por dengue en la década 2000 a 2010 [41]

	Años						
País	**2009**	**2010**	**2011**	**2012**	**2013**	**2014**	**Referencia**
Brasil	1,2,3	1,2,3,4	1,2,3,4	1,2,3,4	1,2,3,4	1,2,3,4	[31] [42]
Chile							
Paraguay	2	1,2,3	1,2	2,4	1,2,4	1,2,4	[35]
Bolivia	1,2,3	1,2,3	1,2,3	1,2,4	1,2,4	-------	[42] [43]
Colombia	1,2,3,4	1,2,3,4	1,2,3,4	1,2,3,4	1,2,3,4	1,2,3,4	[41] [44] [45]
Ecuador	1,4	1	1,2,4	1,2,4	1,2,4	1,2,3,4	[46]
Perú	2,3,4	1,2,3,4	1,2,3,4	1,2,3,4	1,2,3,4	1,2,3,4	[31] [47] [48]
Venezuela	1,2,3,4	1,2,3,4	1,3,4	1,2,3,4	1,2,3,4	1,2,3,4	[31] [49][50]
Argentina	1	1,2,4	1,2	2,3	1,2,4	1,4	[42] [41] [51]
Uruguay	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	

Tabla 3. Presencia de serotipos de dengue en países de Sudamérica, años 2009 a 2014. (El color rojo indica dominancia reportada del serotipo para ese año).N/A Sin datos.

1.2.2 Situación en Ecuador

En Ecuador el primer serotipo que se introdujo fue el DENV-1 en 1988, solo 2 años después se introdujo el DENV-2 tipo americano. En 1993 aparece el DENV-4 que junto a los otros 2 serotipos circularon de manera simultánea, hasta el año 2000, donde finalmente se introdujo el DENV-3 y el DENV-2 tipo asiático[46]. Justamente en ese mismo año se reporta la primera epidemia de dengue clásico en el país [41].

Desde entonces hemos tenido los 4 serotipos de DENV circulando, unas veces todos al mismo tiempo y en otras ocasiones ciertos serotipos desaparecen, pero luego reaparecen al cabo de unos años. El DHF empezó a tomar fuerza con el primer brote en 2003, seguido de brotes epidémicos en el 2005 y 2007 (334 casos en ambos años); luego en 2010 con 307 casos, y 2012 que fue el último año en donde se registró un pico de dengue hemorrágico con 294 casos.[38]Sin embargo en los años mencionados donde hay dos o más serotipos identificados

nos resulta un poco difícil asociarlos directamente a casos de DHF excepto por un año en particular donde circuló un solo serotipo (DENV-1) en el 2010.

De todos los registros de DENV hasta ahora podemos hacer un paréntesis en el año 2010, donde hubo un brote epidémico de DENV no solo a nivel nacional sino a nivel de toda América[31] y el único serotipo que circuló en el Ecuador fue el DENV-1. Cabe recalcar que en ninguno de los años que circularon todos los 4 serotipos de DENV en nuestro país (2000, 2014, 2015) ha habido un brote de DHF, pero sí han causado brotes de dengue clásico. En los años posteriores al 2010 circularon 3 serotipos (1,2,4) hasta que en 2014, luego de 6 años reaparece el serotipo 3[46]. De esta manera, los 4 serotipos volvieron a circular simultáneamente 14 años después, y aun así, no se ha reportado otro brote más de DHF después del 2012[52].

1.3 Filogenia con cepas virales aisladas de Ecuador

En el país se ha generado conocimiento sobre las relaciones genéticas de las cepas de dengue que circulan; se ha generado análisis filogenético usando secuencias de regiones no estructurales como NS5 dando como resultado una estrecha relación genético con cepas aisladas en la región del Caribe[53]. Para el caso de serotipo 1 (DENV-1) detectaron que las cepas ecuatorianas (2005-2007) eran genéticamente distintas a cualquiera que circulaba en Sudamérica. En el caso de DENV-2 se demostró que circulaban cepas en el 2000 de origen caribeño. El dengue serotipo 3 tuvieron orígenes del Caribe y que se detectaron en brotes del 2000, 2001, 2003 y 2004. Para el año 2000 y 2007 circulaban cepas de DENV-4 de origen caribeño, teniendo una relación más estrecha con cepas aislados de Republica Dominicana y más distantes con cepas del sureste de Asia[53].

Los hallazgos más recientes en análisis filogenia del dengue, se dio en la cuidad de Machala, El Oro en el 2014; se indicó la presencia de flujo del virus del dengue en el país junto con cepas provenientes de Colombia y Venezuela. Las cepas aisladas caracterizados como serotipo 1 indicaron un ancestro común en Venezuela (2004 al 2008) y en contraste con cepas DENV-2 se muestra un clado

separado al resto de los taxones de América del Sur [54]. Estos resultados sugierenn que existe un flujo del virus del dengue en el Ecuador (incluyendo intro y reintroduccion) de diferentes serotipos y diferentes linajes desde países cercano.

CAPÍTULO 2

MATERIALES Y MÉTODOS

2. DATOS EPIDEMIOLÓGICAS Y RECONSTRUCCIÓN DE ÁRBOLES FILOGENÉTICOS

2.1. Epidemiologia

Para realizar esta parte del estudio se recurrió a bases de datos del Ministerio de Salud Pública (MSP), del Instituto Nacional de Meteorología e Hidrología (INHAMI) así como información de bases de datos internacionales como la Organización mundial de la Salud y la Organización panamericana de la salud (OMS, OPS) y demás bibliografía referente al DENV.

Se realizó un análisis utilizando estadística descriptiva e inferencial con ayuda del software STATGRAPHICS Centurion para dicho propósito. Se consideraron varios aspectos: la geografía, el género, la edad, factores climáticos y la biología del vector que son algunos de los factores que pueden favorecer al contagio de DENV.

Como factores climáticos se consideraron solo la temperatura y precipitación por ser considerados los aspectos más influyentes sobre la biología y distribución del vector[55]. Para comprobar si existe o no una relación estadísticamente significativa entre los casos de DEN y dichos aspectos, se realizaron análisis de varianza de dos regresiones simples con modelo ajustado (una por cada factor climático).

Para la obtención de estos datos se utilizó como referencia los anuarios climatológicos del INHAMI de los años 2009 a 2012 y se procedió a promediar los valores de precipitación y temperatura de las estaciones meteorológicas por provincia.

2.2. Secuencias virales y reconstrucción de árboles filogenéticos

Para este estudio, las secuencias de nucleótidos del genoma viral del dengue fueron proporcionadas por el Instituto Nacional de Investigación de Salud Pública del Ecuador (INSPI). Estas secuencias provienen aislados virales de pacientes de varias ciudades a nivel nacional durante periodo del 2009 al 2013 con sus respectivos información, tales como: edad, sexo, cuidad y provincia.

Región	Provincia	Genes virales	
		CprM*	E*
Costa	Esmeraldas	1	1
	Manabí	7	5
	Los Ríos	9	6
	Santa Elena	3	2
	Guayas	28	12
	El Oro	2	2
Sierra	Bolívar	1	1
Oriente	Orellana	3	0
	Zamora Santiago	1	0
	Zamora Chinchipe	1	1
Insular	Galápagos	2	3

Tabla 4. Números de secuencias de nucleótidos del virus de dengue detectados en pacientes a nivel nacional y analizados en el presente estudio. Periodo: 2009-2014. *Regiones virales: C (Cápside), prM (precursora de membrana) y E (Envoltura)

Las regiones del genoma de las muestras de aislados virales en estudio fueron las regiones codificantes de una sección parcial de la cápside (C), de la estructura proteica pre-membranal (prM) y la región completa del gen de envoltura (E). Con las posiciones de 117-328 para la región la cápside(C) ;328-477 para la región pre-membrana (prM) y desde la posición 2176-2416 para la región parcial de envoltura(E).

Para un análisis preciso, las lecturas de nucleótidos (Cobertura 76.8-98.2%) fueron inspeccionadas en calidad y pre-procesadas en el software Geneious v4.8.4.

Las secuencias en bruto se confirmaron ejecutando la herramienta básica de alineamiento local (BLAST) disponible en el sitio web del Centro Nacional de Información biotecnológico (NCBI): las secuencias de referencias se obtuvieron del banco de genes (GenBank) de este mismo sitio web.

Cada cepa de referencia está etiquetada por su código de acceso GenBank, país de origen y año de aislamiento, y para las muestras clínicas aisladas en estudio se etiqueta con código de cepa, cuidad y año de detección.

2.2.1. Cepas virales del Dengue serotipo 1

Se utilizó un conjunto de secuencias (n=16) aislados de muestras clínicas representativos del serotipo 1 detectados y aislados entre el 2009 y 2013 en Ecuador y secuencias de referencia (n=45) de diferentes genotipos: I(Asia), II, III(Malaysia), IV(South Pacific), V(American/Africa) y selvática; ambos de la región de envoltura (E) del genoma viral.
Estas secuencias se alinearon mediante ClustalW [56] con el software MEGA7. Para medir las distancias genéticas de las secuencias se usó el modelo algorítmico Kimura 2 de Neighbor-Joining reconstruyendo su filogenética. Se evaluó la robustez de los árboles filogenéticos con un análisis de 1000 réplicas de remuestreo de arranque (bootstrap). Adicionalmente se realizó un análisis filogenético de suplemento de máxima verosimilitud mediante el método bayesiano disponible en BEAST v1.8.4 con un mínimo de 30 millones de generaciones y un quemado (burn-in) del 10%. El modelo se sustitución usado fue el General Time Reversible (GTR) con un sitio de heterogeneidad Gama de categoría 4. El reloj molecular estricto y el modelo coalescente del horizonte bayesiano (Bayesian Skyline) con grupo de 5 intervalos fueron usado para este análisis. Los intervalos de densidad de probabilidad 95% más alta (HPD) proporciona el grado de incertidumbre y fue medido en el software Tracer v16.0, junto con el tamaño respectivo de muestreo efectivo (ESS). Finalmente se visualiza el árbol consenso en el software FigTree v1.4.3 junto con los números de probabilidades posteriores (porcentajes). Todas las longitudes de rama horizontales se dibujan en una escala de sustitución por sitio para el análisis filogenético y para la distancia genética se muestra los valores de bootstrap. Estas condiciones previamente fueron reportados [57], con ciertas modificaciones de los autores.

2.2.2. Cepas virales del Dengue serotipo 2

El método de búsqueda de árboles basados en criterios de optimización Máxima Versosimilud (ML) de MEGA7 fue utilizado para la reconstrucción de árboles filogenéticas de las cepas Denv-2 de la región del gen de envoltura. Se compararon un total de 8 nuevas secuencias de esta región provenientes de 6 ciudades costeras del Ecuador, aisladas en el periodo 2012 y 2014 con 56 cepas secuenciadas de todo el mundo de los 4 genotipos existentes (Asian I, Asian II, American/African, American, Cosmopolitan) disponible en GenBank. Todos estos conglomerados de secuencias se alinearon mediante el método CLUSTAL W. La topología de los árboles se evaluó con un método de replicación de matrices de datos (1000 veces) en MEGA7. Para el análisis filogenético se uso el método se algoritmos de cadena de Markov de Monte Carlo (MCMC). El método de sustitución fue GTR y como distribución gamma categoría 4 e Intervalos (G4+I). El mdelo de reloj molecular fue el estricto corriendo 10 millones de generaciones, tiempo suficiente para encontrar divergencia en las muestras, para después armar un árbol de credibilidad de clado máximo provenientes de 10 mil árboles usando TreeAnotator v1.8.4. Finalmente se visualizó el consenso de los arboles filogenéticas en el software FigTree v1.4.3.

2.2.3. Cepas virales del Dengue serotipo 3

Se usaron cepas DENV-3 secuenciadas que fueron detectadas únicamente en el año 2014. No se detectaron en periodos anteriores de este estudio (2009-2013) dicho serotipo.

Para el análisis de la región de envoltura “E-gene”, el paquete de software de Análisis evolutivo bayesiano mediante el muestreo de árboles (BEAST) fue apropiado para realizar dicho análisis [58]. El año de divergencia de cada clado se estimó mediante un reloj molecular relajado utilizando el método MCMC disponible en BEAST v1.8.4 atribuyendo información sobre el tiempo de muestreo de cada cepa. Este análisis usó un reloj molecular relajado; un modelo de sustitución GTR con sitio de heterogeneidad Gama con numero de categoría 4 y un modelo coalescente del horizonte bayesiano (Bayesian Skyline) con grupos de 5 intervalos. Todas las cadenas se corrieron 20 millones de generaciones, tiempo suficiente para verificar a convergencia: se realizó un quemado (burn-in) del 10% mediante el software TreeAnnotator v1.8.4. La convergencia de parámetros durante la MCMC se inspeccionó con Tracer v.1.6.0 junto con los intervalos de densidad de probabilidad 95% más alta (HPD) que proporciona el grado de incertidumbre. Mientras que el grado de apoyo de los nodos en el árbol se proporcionan con valores de

probabilidad posteriores graficados en el software FigTree v1.4.3. Estas condiciones fueron previamente reportados, con ciertas modificaciones de los autores [57]. También se usó el modelo Neighbor-Joining (NJ) con un modelo Kimura para un análisis filogenético y según referencia más reciente recomiendan un método de máxima verosimilitud basado en el modelo de 2 parámetros de Kimura en software de MEGA7. Se realizó pruebas de arranque (bootstrap) de 1000 réplicas de los taxones asociados agrupando el porcentaje de árboles.

Para la región parcial de cápside(C) y precursora de membrana (prM) se reconstruyó un árbol filogenético con 21 secuencias que proveniente de GenBank junto con 2 secuencias de las muestras aisladas (CW340-CW341) en la ciudad de Guayaquil en el 2014; para esto se usó el software MEGA7. El método de agrupación Neighbor-joining implementando el modelo Tamura-Nei se usó para calcular las matrices de distancia entre estas cepas. Se replicaron 1000 árboles para obtener los valores de remuestreo de arranque (Bootstrap) que se muestran en los nodos. Este método fue efectivo para encontrar una asociación entre el [59]

2.2.4. Cepas virales del Dengue serotipo 4

Las cepas DENV-4 analizadas en este estudio comprenden dos conjuntos de secuencias: El primero conjunto secuencias (n=5) con la región de envoltura (E-gen) y el segundo conjunto (n=11) con región de C-prM (Cápside y precursora de membrana) aislados de muestras clínicas representativos del periodo 2011 al 2014 en Ecuador.
Las secuencias de referencia usados para ambos conjuntos provienen del GenBank (21 de E-gen y 30 de C-prM); estos se compararon con los diferentes genotipos (I, II y III) usado en una investigación reciente sobre el primer análisis del serotipo 4 en Brazil[60]. Estas secuencias de alinearon mediante ClustalW con el software MEGA7. Para este análisis se usó el modelo de sustitución General Time Reversible con variables de gama (categoría 10) e intervalos (GTR+G10+I) con frecuencia de base estimada, que fue encontrado como el mejor modelo de acuerdo a las pruebas en jModelTest v2.1.3. El modelo de reloj molecular usado fue relajado no correlacionado con distribución exponencial. Las estimaciones filogenéticas se realizaron mediante el marco MCMC. Para visualizar el año de convergencia aproximado entre los genotipos se usó Tracer v1.6.0. Para mostrar dicha convergencia en todos los parámetros se ejecutaron 20 millones de cadenas muestreándose cada 2 mil pasos. El árbol de credibilidad de clado máximo proviene de 10 mil árboles usando TreeAnotator v1.8.4 realizando un quemado (burn-in as state) del 10% y visualizado en FigTree

v1.4.3 Estas condiciones fueron previamente reportadas para el análisis del Dengue serotipo 4[60].

CAPÍTULO 3

ANÁLISIS DE RESULTADOS

3. FACTORES INFLUYENTES DEL DENGUE, CASOS REPORTADOS Y DESCRIPCION DE GENOTIPAJE CIRCULANTES

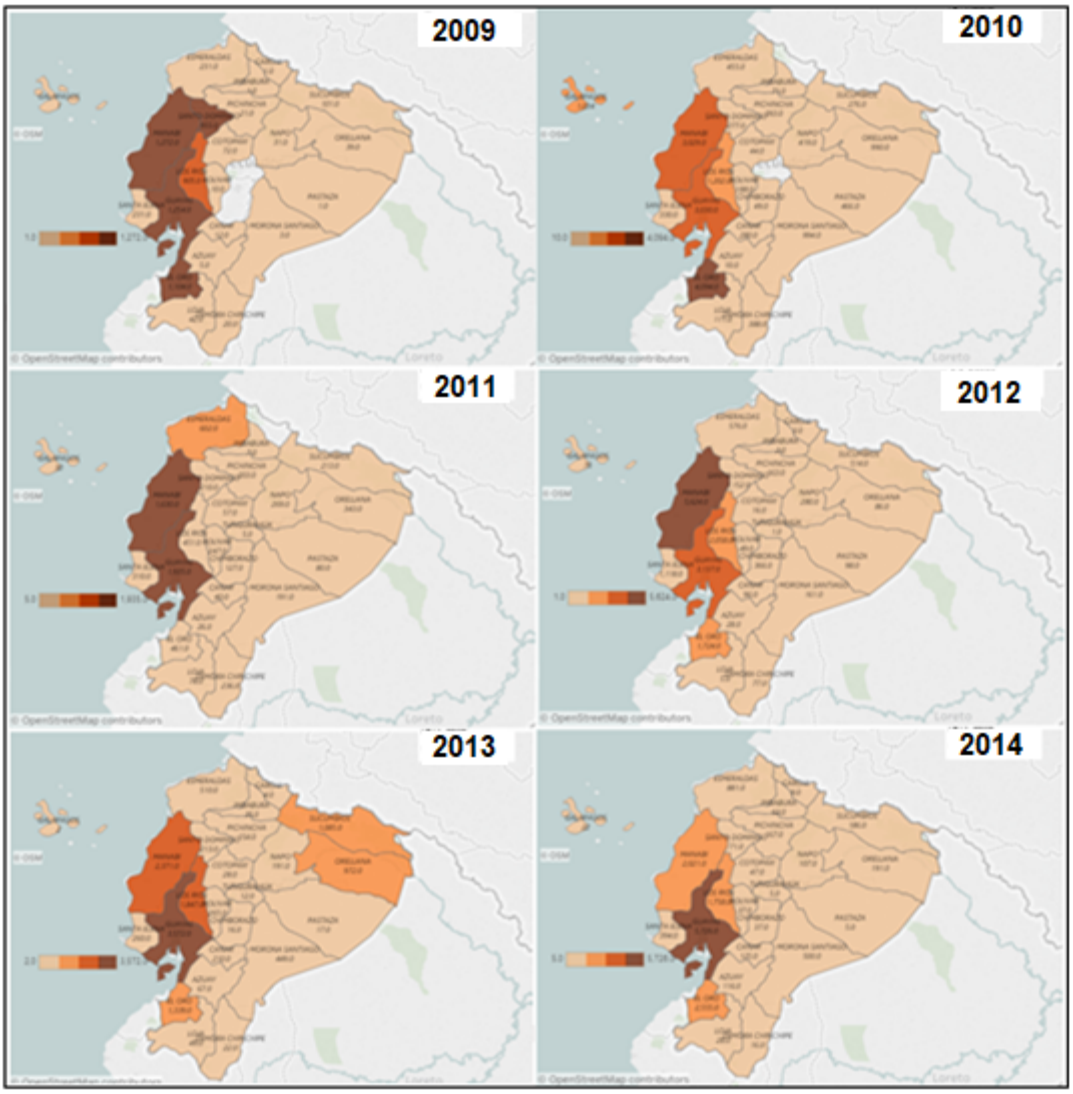
3.1. Edad y Sexo

Edad (años)	Frecuencia	%
0-10	19	33.3
11-20	22	38.6
21-30	9	16
31-40	4	7
41-50	3	5
Media:17 años		
Género	Frecuencia	%
Femenino	27	49
Masculino	28	51

Tabla 5. Frecuencias de edad y género de pacientes cuyas cepas virales de dengue fueron analizados en este estudio. Datos proporcionados por el INSPI

Observamos en la tabla 2 que la mayoría de casos se divide entre niños menores de 11 años y jóvenes de hasta 20 años. La media de edad resultó 17 años lo que denota que los adolescentes son muy vulnerables a la enfermedad y no solo los niños. En cuanto a sexo observamos que hay una paridad entre hombres y mujeres con una relación

3.2. Geografía



1.Figura 3.2.1: Mapas del Ecuador mostrando las provincias más afectadas por dengue durante los años 2009-2014 según MSP

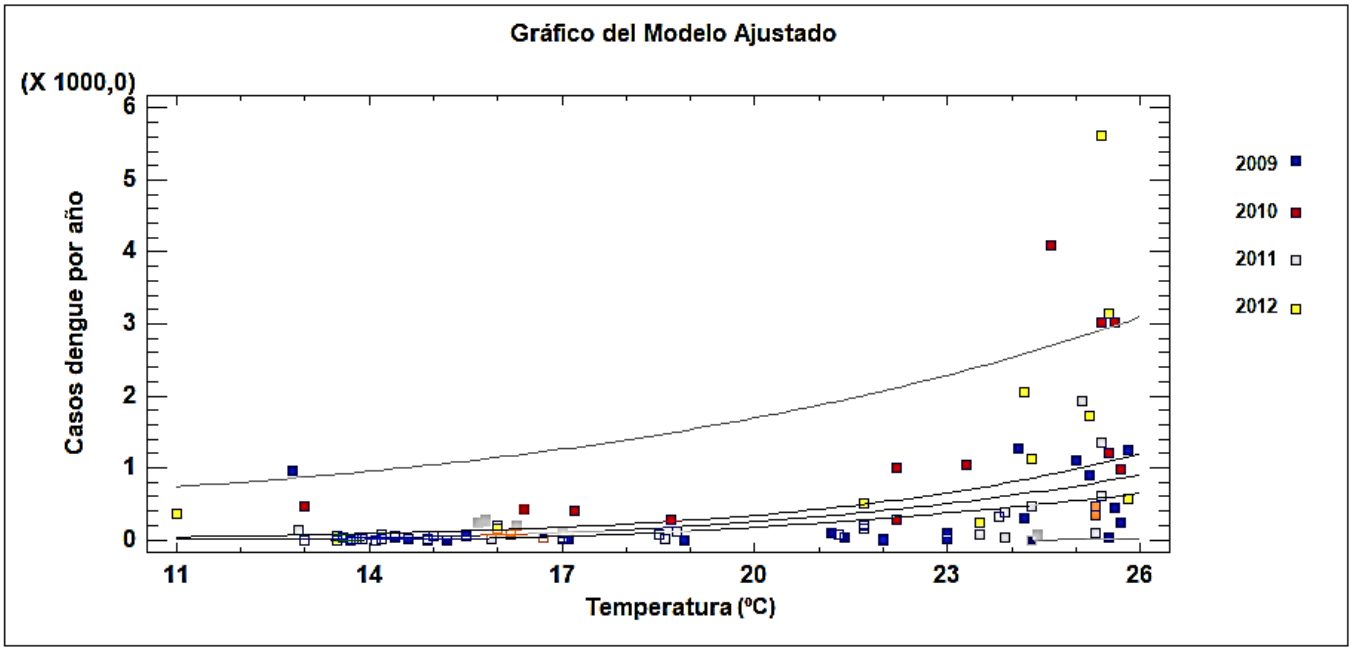
En los seis años las provincias que se ubicaron en colores oscuros (mayor afectación) fueron: Esmeraldas, Manabí, Guayas, Los Ríos, El Oro, Santo Domingo, Sucumbíos y la provincia de Orellana. La mayoría de estas provincias pertenecen a la Costa, siendo Guayas y Manabí las más afectadas.

3.3 Factores climáticos

Para la variable Temperatura (ºC) se usó el modelo ajustado Raíz Cuadrada-Y Cuadrado-X: Y = (a + b*X^2)^2. El valor –P resultó 0 (menor a 0.05) con lo que se comprobó una relación estadísticamente significativa en los casos de dengue (variable dependiente) y la temperatura (variable independiente) con una confianza del 95%.

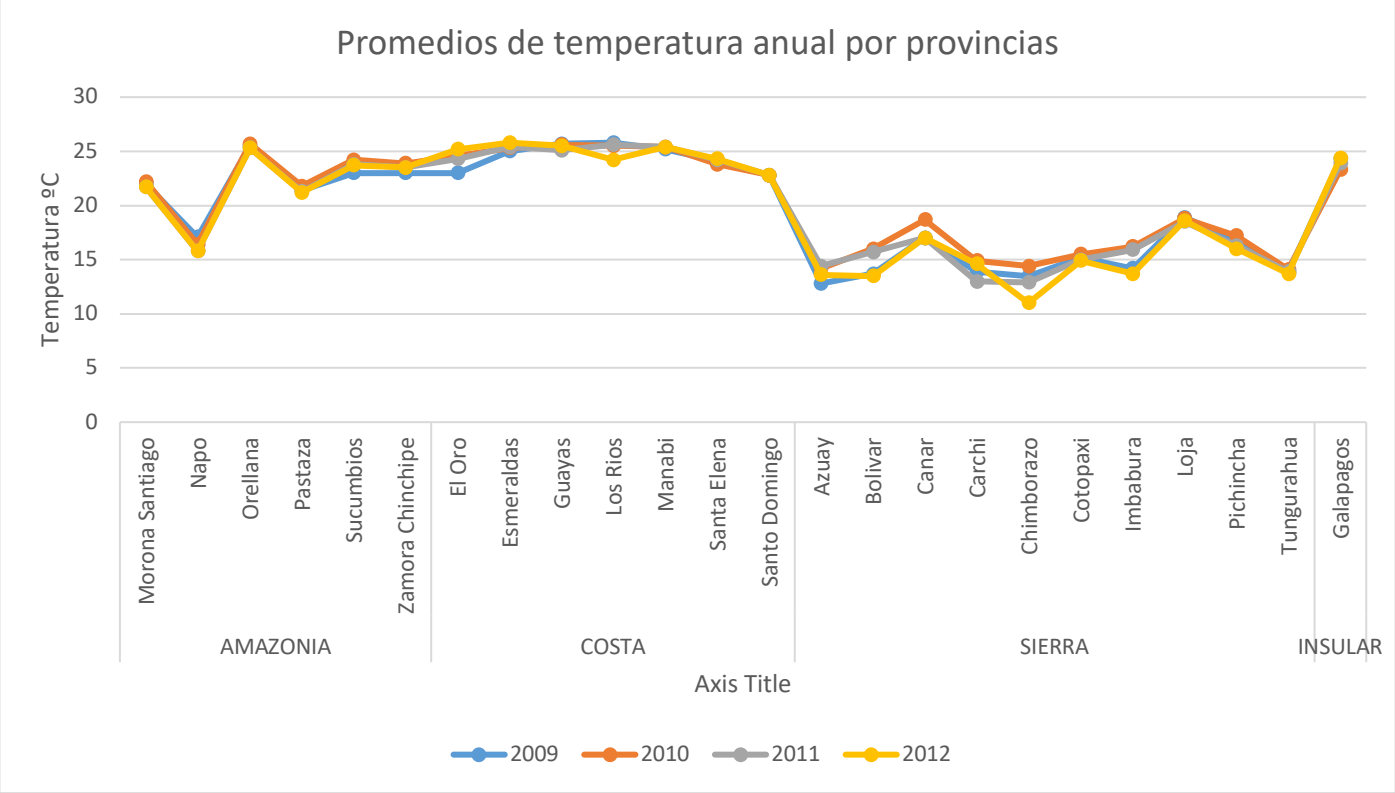
El estadístico R-Cuadrada indicó que el modelo ajustado explica 36,0618% de la variabilidad en los casos dengue por año, mientras que el coeficiente de correlación resultó 0,6 lo cual indicó una relación moderadamente fuerte entre variables.

En cuanto a la variable Precipitación (mm) el valor -P resultó 0.2965 (mayor a 0.05) con lo cual se descartó una relación estadísticamente significativa entre los casos de dengue (variable dependiente) y la precipitación (variable independiente).



1.Gráfico 3.3.1 Modelo ajustado de los casos de dengue por año y Temperatura ºC.

Nótese que los años 2010 y 2012 (brotes de DHF) se observan como puntos atípicos en el gráfico.



2.Gráfico3.3.2 Promedios de temperatura anual por provincias en los años 2009 a 2012

3.4 Casos reportados

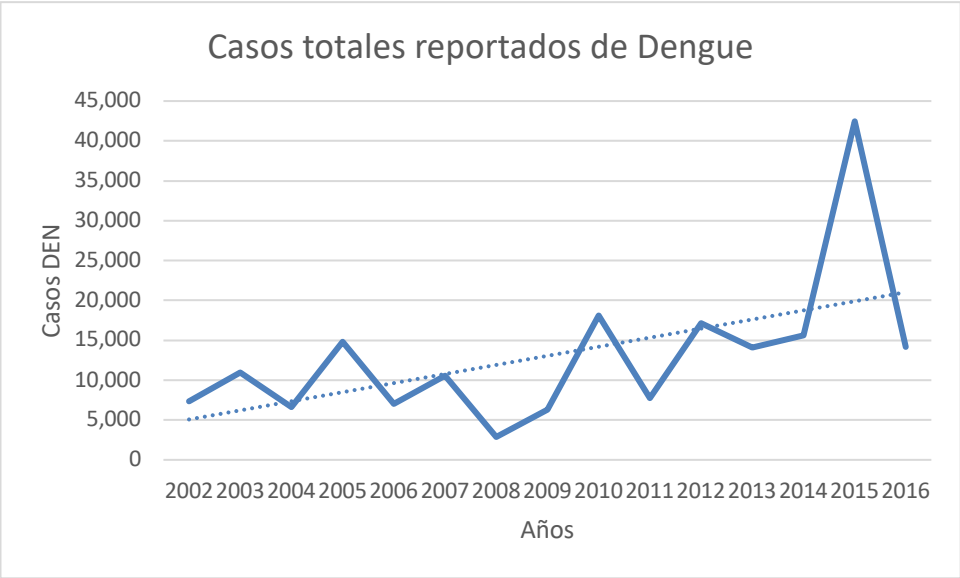
Teniendo en cuenta que la temperatura óptima de transmisión del dengue es aproximadamente 29ºC[55], vemos en el gráficos que las provincias de la región costa, la provincia de Orellana y Galápagos se ajustan a la línea de temperatura de 25ºC.

3.4 Registros históricos de casos de DEN, DHF y víctimas mortales en Ecuador.

Año	Casos DHF	Víctimas mortales
2002	134	7
2003	206	10
2004	64	8
2005	334	44

2006	179	24
2007	334	23
2008	31	12
2009	99	14
2010	307	35
2011	92	16
2012	294	23
2013	73	11
2014	55	12
2015	55	8
2016	39	4

Tabla 6. Registros de dengue hemorrágico y mortalidad desde el año 2002 hasta el 2016 según MSP



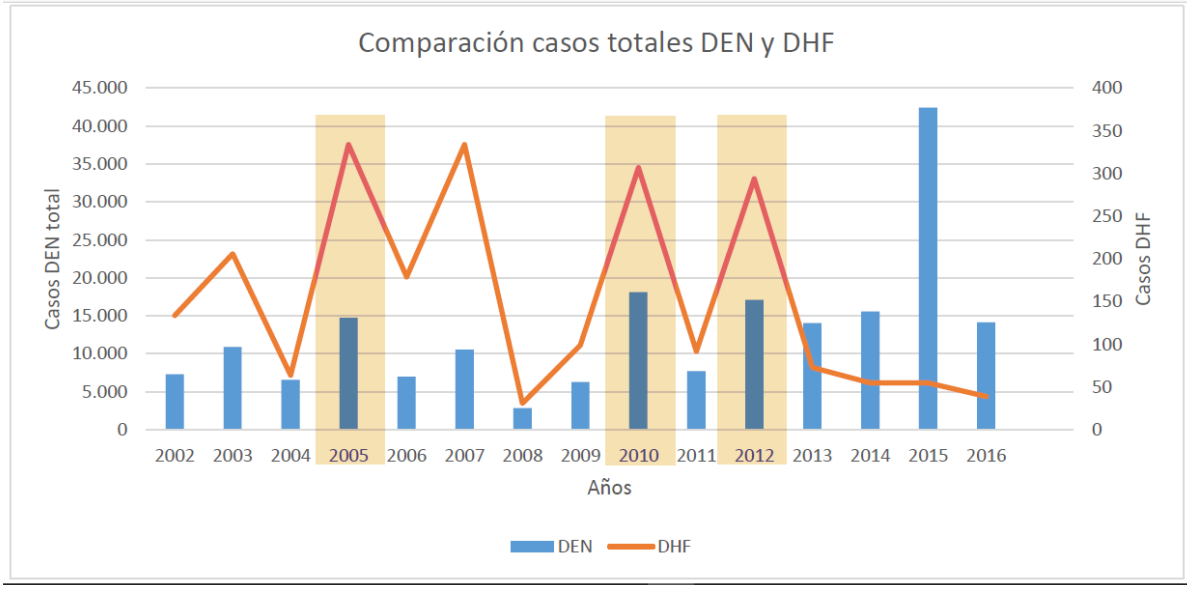
3.Gráfico 3.4.1 Casos totales reportados de dengue y DHF en Ecuador años 2002-2016

Desde que se tienen registros de los casos de dengue en nuestro país, el año con mayor número de casos de dengue reportados ha sido 2015 con más de 42,000 y el año con menos casos ha sido 2008 con menos de 3,000 casos. La línea de tendencia es positiva, lo cual representa un número de casos de dengue en aumento.

4.Gráfico 3.4.2 Casos de DHF años 2002 a 2016

En el gráfico se observa que la línea de tendencia es negativa, lo cual quiere decir que desde 2007 cada vez que hay un brote de dengue hemorrágico los casos disminuyen. Además, somos el país de la región con la tasa de letalidad por dengue más baja[61].

Si nos fijamos bien en los años y brotes de dengue hemorrágico, parece haber un patrón de 2 a 3 años cada vez que sucede un brote. Sin embargo, esto no siempre se cumple; si ese fuera el caso hubiéramos tenido otro brote de DHF en 2014 o 2015 lo cual no ocurrió.



5.Gráfico 3.4.3 Casos totales de dengue Y DHF reportados años 2002 a 2016

Para visualizar mejor los gráficos anteriores, hemos puesto los casos totales de dengue y DHF juntos. Notamos que en los años donde hubo más casos de dengue no necesariamente hubo brotes de DHF; el año 2015 es un claro ejemplo de esto.

3.5. Circulación de serotipos y su respectiva dominancia en los años de análisis.

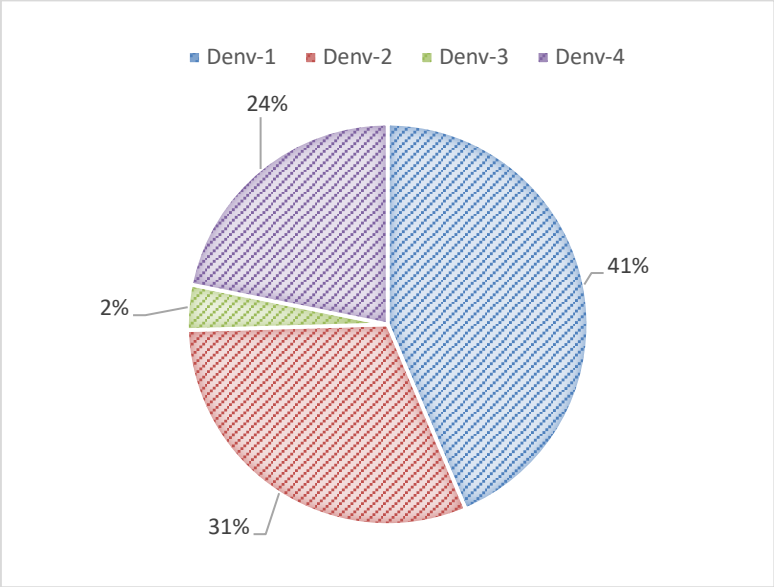
Año	Serotipos	Dominancia	Dengue clásico	Dengue hemorrágico	Total
2009	1,4	1	6212	99	6311
2010	1	1	17823	307	18130
2011	1,2,4	1	7659	92	7751
2012	1,2,4	1	17116	294	17410
2013	1,2,4	2	13630	73	13703
2014	1,2,3,4	2	15011	55	15066

Tabla 7. Años, serotipos, dominancia y número de casos de dengue clásico y hemorrágico según el INSPI y el MPS [46].

Notamos que, en los años de brotes de DHF, tanto en 2010 como en 2012, predominó el serotipo 1. En los años posteriores se reportaron pocos casos de DHF y predominó el serotipo 2.

3.6. Distribución serotípica y genotípica del virus dengue en el Ecuador

Un total de 98 secuencias proporcionadas para este estudio, fueron usadas para generar 8 los arboles filogenéticos que describan la situación del Ecuador con respecto a la distribución de cada serotipo del dengue con sus genotipos circulantes en los años 2009 al 2014. Cada árbol filogenético posee sus respectivas secuencias de referencias de cada genotipo por cada serotipo. Se construyeron de acuerdo a las regiones virales de cápside, precursora de membrana (CprM) y envoltura(E). Del total de secuencias se usaron 54 con la región CprM y 37 con la región E. Solo el 60 % de pacientes proporcionaban secuencias con ambas regiones, por lo tanto, se decidió generar arboles por cada región viral mencionadas anteriormente.



6.Gráfico 3.6. Porcentajes de pacientes analizados en el presente estudio con sus respectivos serotipos de dengue detectados en clínicamente.

En el periodo de estudio se obtuvieron genotipos diversos según el serotipo que se muestran a continuación:

Serotipo 1 (DENV-1)

Un total de 24 pacientes que corresponden al 41%, fueron analizados en este estudio y se comprobó que las cepas virales aislados de estos pertenecen al serotipo 1. Tres

cepas correspondes al 2009, tres cepas al 2010, nueve cepas al 2011, ocho al 2012 y dos al 2013.
Las cepas aisladas fueron clasificaron como el genotipo V denominado Americano/Africano (Am/Af), se distribuyeron en las provincias del Guayas (2009-2013), el Oro (2012), Manabí (2011-2012), Los Ríos (2012), Esmeraldas (2009), Guaranda (2012), Macas (2011), Zamora Chinchipe (2012) y Santa Elena (2011).

Serotipos 2 (DENV-2)
Un total de 18 pacientes que corresponden al 31% analizados en este estudio se comprobó que las cepas virales detectados en estos pertenecen al DENV-2. Una cepa del 2009, seis del 2012, siete del 2013 y 4 del 2014, En el año 2010 de mayor brote de dengue (clásico y severo) no circuló este serotipo DENV-2[46].
Las cepas en estudio correspondiente al DENV-2 fueron agrupadas en el genotipo III denominado genotipo Americano/Asiático (Am/As).
Las provincias en las que se distribuyeron fueron: el Guayas (2012-2014), Manabí (2012), Los Ríos (2014), Santa Elena (2012) y Azuay (2012)

Serotipos 3 (DENV-3)
Un 4% de pacientes analizados en este estudio se comprobaron que las cepas virales aislados en estos, pertenecen al DENV-3.
Las cepas aisladas fueron provenientes de Guayaquil en el año 2014; cabe recalcar que es la primera vez en 6 años que aparece este serotipo en el país, ya que, la última vez que se reportó fue a finales del 2008 [62] , Lo cual nos indica que aparentemente surgió en esta ciudad.
Estos aislados se clasificó como genotipo III con una confianza del 100% según lo que muestras los arboles filogenéticos usando tanto la región de envoltura como la región de la cápside y pre-membrana.

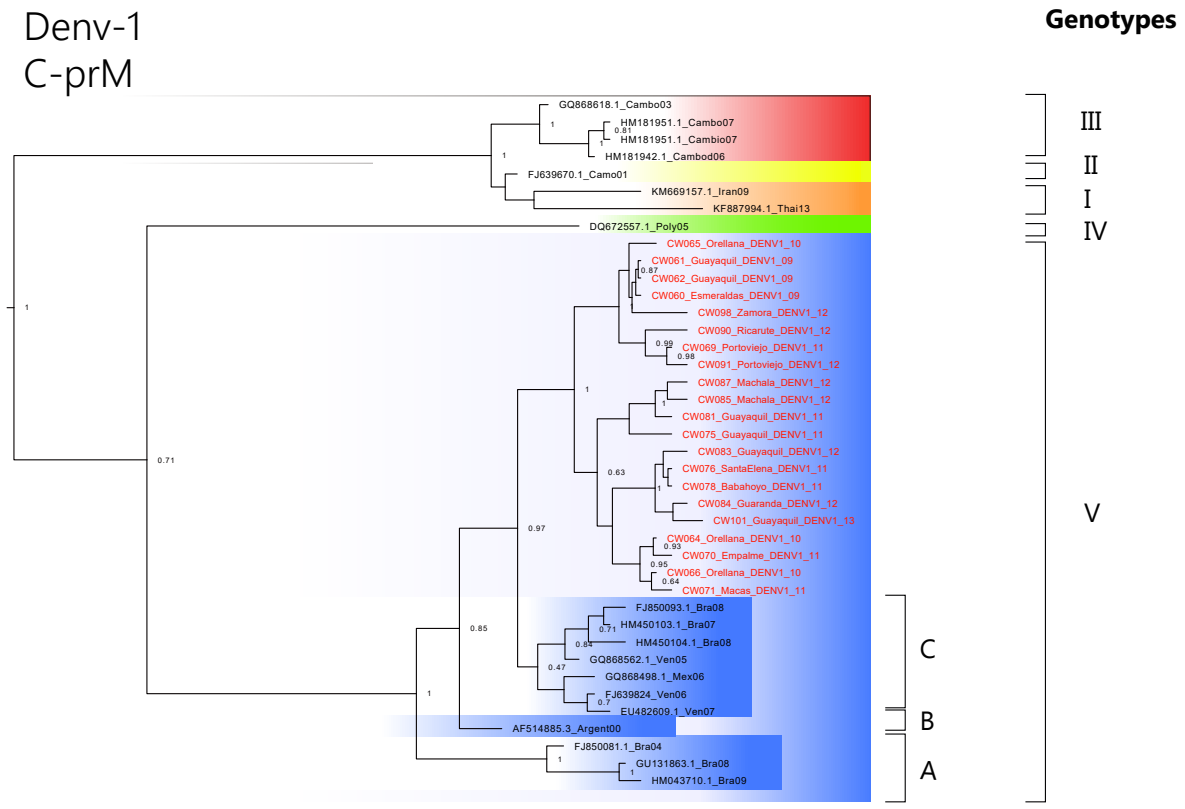
Serotipos 4 (DENV-4)
Un total de 13 pacientes que corresponden al 24% analizados en este estudio se aislaron cepas virales pertenecientes al DENV-4.
Los aislados se clasificaron como Genotipo II y ha circula en todos los años de estudio con excepción al 2010, uno de los años donde se detectó un gran pico de brote de dengue clásico y hemorrágico en el país.
Para el año 2011 se analizó siete cepas, 4 para el 2012, uno para el 2013 y 2 para el 2014.

3.7 Arboles filogenéticos de los cuatro serotipos del DENV.

3.7.1 Dengue Serotipo 1 (DENV-1)

Las muestras virales detectados como DENV-1 fueron aislados en Manabí, Los Ríos, Santa Elena, Guayas, El Oro, Azuay, Bolívar, Zamora Chinchipe, Orellana y Morona Santiago entre los años 2009-2013.

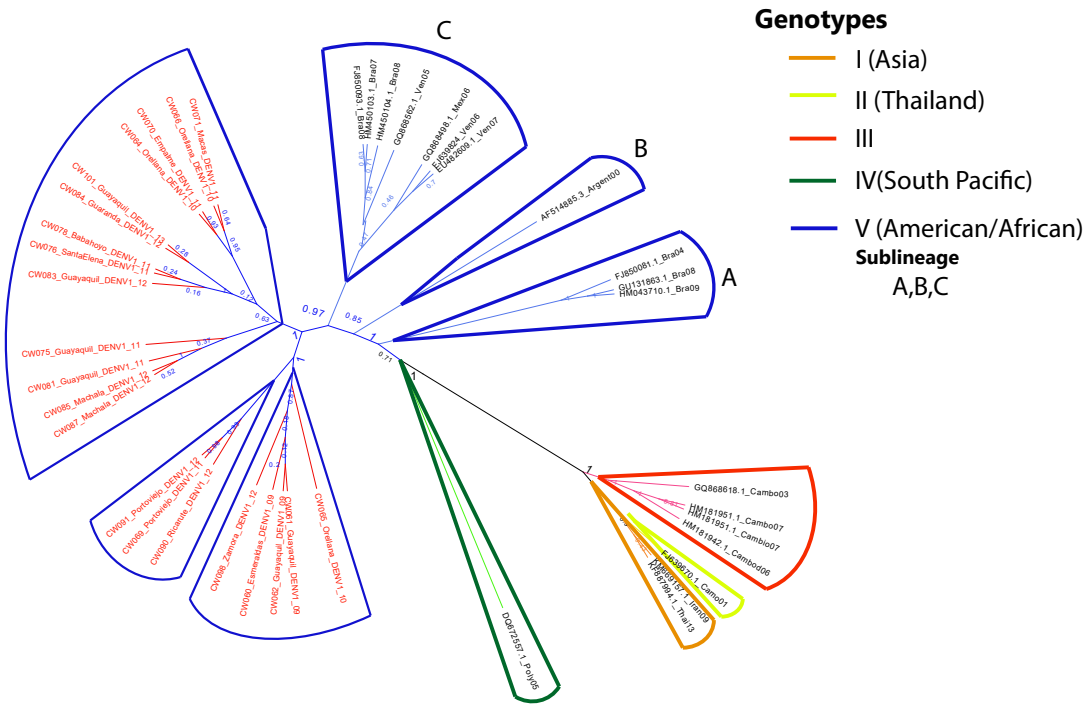
3.7.1.1 Región de Cápside y precursora de membrana (C-prM)



2.Figura 3.7.1.1[a] Distribución de secuencias basados en la región CprM del virus del dengue. El árbol fue construido usando el método de Máxima verosimilitud con un modelo GTR+G4+I, reloj molecular stricto, Bayesian Skyline con 5 grupos y con una corrida con 30 millones de generaciones. **Secuencias ecuatorianas analizadas en este estudio están con color de fuente rojo.**

En primera instancia como se observa que las muestras ecuatorianas no se agrupan dentro de un mismo clado en el genotipo V (Am/As), surge una investigación más exhaustiva con respecto a los sub-linajes de este genotipo V.

Para ello se descargaron secuencias referencias caracterizadas por su sublinaje (A-B-C), proveniente en su mayoría de Brasil, también de Argentina, Venezuela, y México aislados previo a nuestro periodo de estudio.



3 Figura 3.7.1.1[b] Árbol filogenético usando la región CprM en disposición radial muestra la divergencia de cepas ecuatorianas (2009-2012) distintos a las cepas caracterizada como sublinaje A, B y C del mismo genotipo V (Am/Af) donde estas se agrupan. Valores bootstrap >97% afirman los aparentes nuevo sublinajes. Secuencias ecuatorianas analizadas en este estudio están con color de fuente rojo.

Visto de otra manera en este árbol filogenético en disposición radial (*Figura 3.7.2 b*) se observa que existen tres aparentes nuevos sublinajes que difieren con un valor posterior entre 97-100% al resto de los sublinajes A, B y C.

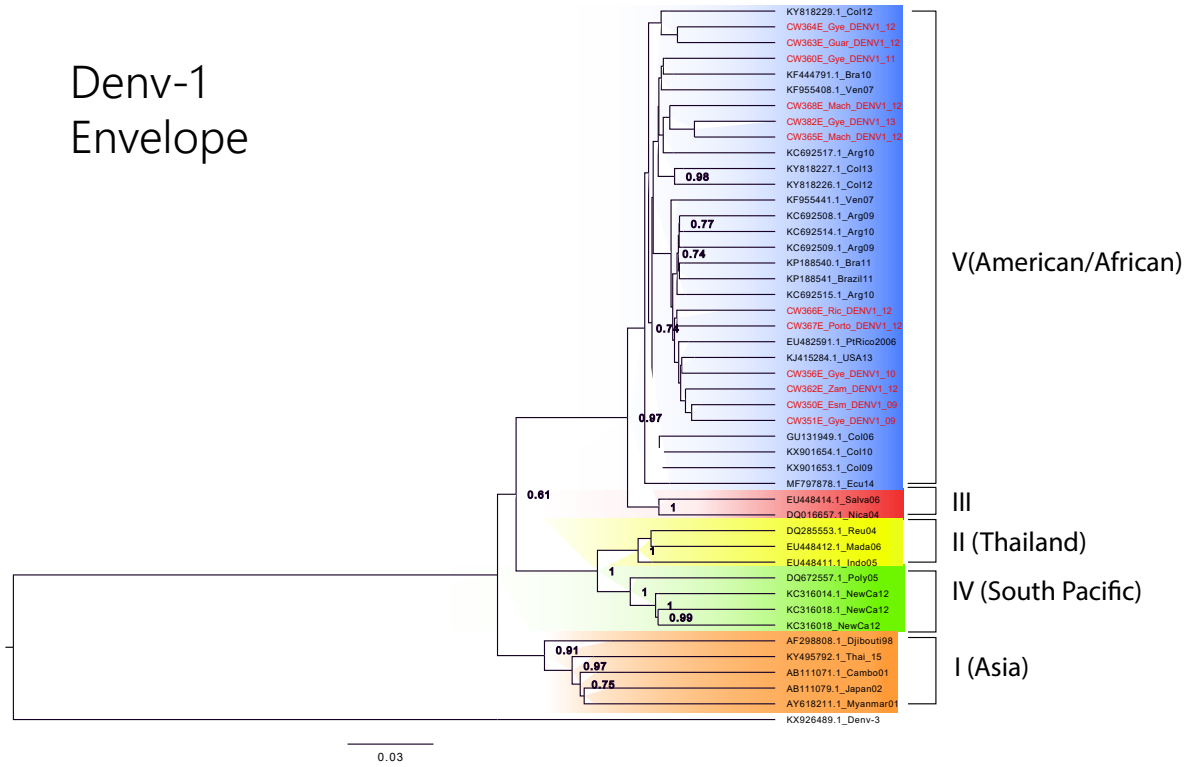
Analizando cada clado se puede observar que existen probablemente 3 sitio donde se originando dichos sublinajes aparentemente nuevos en el país. El primero desde este del país en la provincia del Guayas (2009), el segundo y el tercero podría surgir el Noreste del país, la provincia de Orellana (2010) y el cuarto desde Portoviejo-Manabí (2011). La separación de los aparenten nuevos sublinajes poseen un numero posterior del 97% que se divergen 3 grupos con posterior del 100%.

3.7.1.2 Región de Envoltura (E)

La región de envoltura del dengue tiene alrededor de 1485 nucleótidos, pero las muestras usadas en este análisis poseían entre 380-401, de las cuales se alinearon 249 nucleótidos que eran la parte final de esta región.

Las muestras o aislamientos (n=12 secuencias) de DENV-1 usados en este estudio tienen una identidad entre el 97-100% a cualquier otras aislado subido a la plataforma de GenBank. Las cepas CW382 y CW362 tuvieron el menor grado de identidad provocado por inversión e inserción y en su mayoría por sustitución de nucleótidos; el primero fue aislado en Guayaquil en el 2013 y el segundo en Zamora en el 2012.

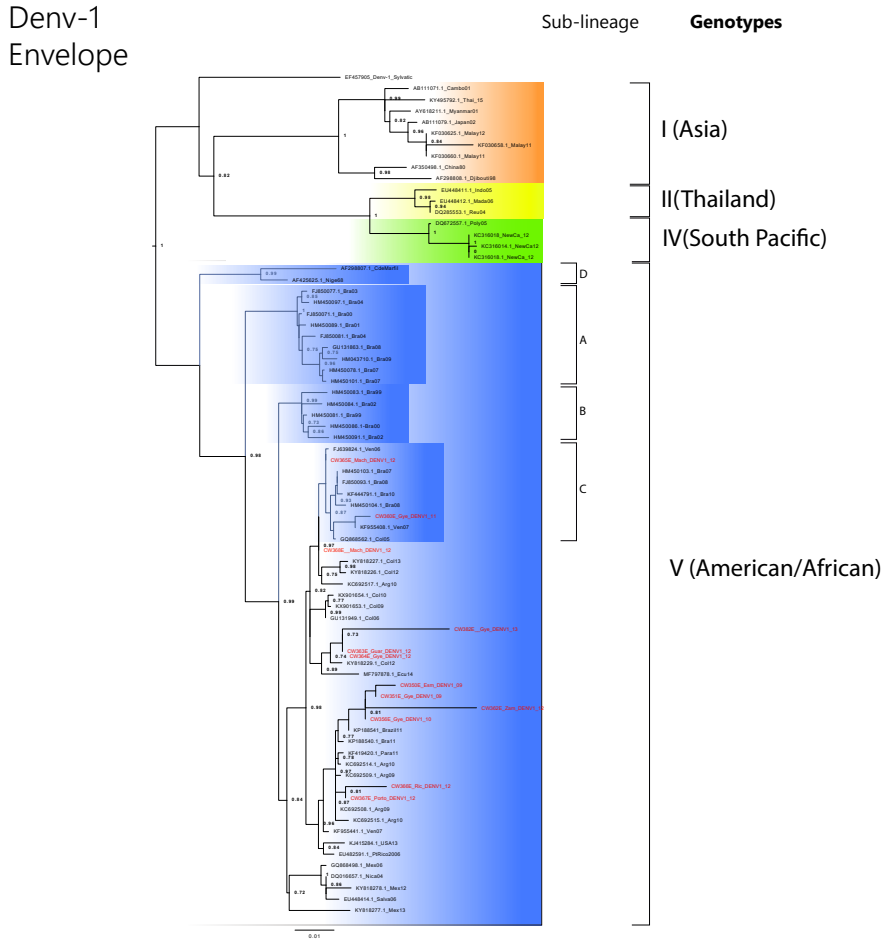
La reconstrucción filogenética realizada por el método de Neighbor-Joining se describe 4 linaje o genotipos basada en la región de envoltura del serotipo 1 (*Figura 3.7.1 a*). Las muestras (en color rojo) se alinean en el clado del genotipo V (Americano/Africano). Estas secuencias provienen desde el norte del país (Esmeraldas) en el 2009 hasta el sur (El Oro) en el 2012, desde el este (Guayas) desde el 2009 hasta el Oeste (Orellana) en el 2012 y en el centro del país (Bolívar) en el 2012.



4.Figura 3.7.1.2[a] Árbol filogenético construido mediante de Test de Neighbor-Joining con un numero de 1000 replicaciones, con un modelo se sustitución de Kimura 2-parameters y un tratamiento de datos de eliminación por pares; todas las posiciones de codones fueron seleccionados.

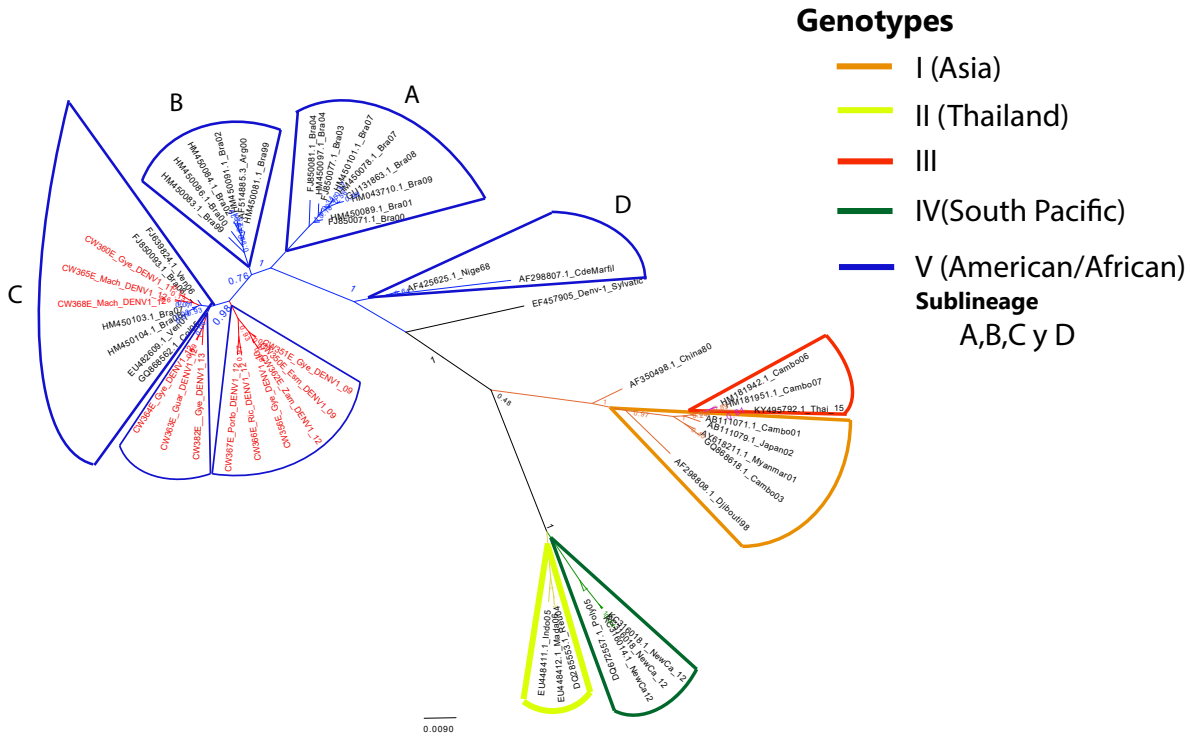
Los linajes que correspondientes al serotipo 1 del dengue (DENV-1) se clasifican en 5 clados bien definidos provenientes de Asia (Genotipo 1), Tailandia (Genotipo 2), Genotipo III, del Pacifico Sur (Genotipo IV) y de origen Americano/Africano (Genotipo V). Las secuencias de nucleótidos del gen de Envoltura de las 12 muestras se clasifican dentro de este último genotipo, que también incluyen virus DENV-1 de países como Brasil, Argentina, Colombia, Venezuela, Puerto Rico y Estados Unidos.

Las cepas CW382 y CW363 poseen un porcentaje de identidad menor al 97% y para la cepa CW365 y CW366 menor a 98% según un blasteo realizado en blast.ncbi.nlm.nih.gov. Según el árbol construido (*Figura 3.7.2 a*) estos pares de cepas aisladas, divergente entre sí del resto de cepas forma un clado entre ellas.



5.Figura 3.7.1.2[b] Árbol filogenético de Máxima Verosimilitud construido mediante el editor gráfico de alineación de secuencia múltiples SEAVIEW usando PhyML. Modelo de sustitución GTR con una tasa de variación por sitio de categoría 4 y con un número de 1000 replicaciones. Secuencias ecuatorianas analizadas en este estudio están con color de fuente rojo.

Para aclarar la observación se las divergencias en diferentes caldo que ha tenido las cepas ecuatorianas, agregamos secuencias caracterizadas como sublinajes A,B,C y D del genotipo Am/Af donde se alinearon nuestras secuencias en primer instancia. Algunas cepas ecuatoriano no se alinearon a ninguno de estos sublinajes, por lo cual decidimos profundizar construyendo un árbol



6.Figura 3.7.1.2[c] Árbol filogenético construido con alineamiento de la región E, en disposición radial confirma la divergencia para ciertas cepas ecuatorianas (2009-2013) distintos a las cepas caracterizada como sublinaje A, B y C del mismo genotipo V (Am/Af). Secuencias ecuatorianas analizadas en este estudio están con color de fuente rojo

El árbol filogenético construido mediante secuencias correspondientes a la región E (*Figura3.7.1.2[c]*), a comparación del árbol usando otra región (CprM) (*Figura3.7.1.1[c]*) muestra que las cepas existen secuencias ecuatorianas (CW360E, CW365E,CW368E) que pertenecen al sublinaje C del genotipo V (Am/Af) mientras que para otras cepas confirma la aparente circulación de un nuevo sublinaje usando ambos regiones (CrpM y E). Estas cepas se caracterizan en la Tabla 8.

Nuevo sublinaje			DENV-1			
Pacientes	Region Viral		Genero	Edad	Provincia	Ingreso
	Cprm	E				
1	CW060	CW350	Masculino	21	Esmeraldas	2009
2	CW061	CW351	Femenino	10	Los Rios	2009
3	CW065	CW355	___-----___	32	Orellana	2010
4	CW083	CW364	Masculino	10	Guayas	2012
5	CW084	CW363	Masculino	49	Guaranda	2012
6	CW090	CW366	Femenino	9	Los Rios	2012
7	CW091	CW367	Masculino	17	Manabi	2012
8	CW098	CW362	Femenino	28	Zamora	2012
9	CW101	CW382	Masculino	38	Guayas	2013

Tabla 8. Información de pacientes cuyas secuencias virales aisladas divergen del resto de sublinajes (caracterizados en GenBank) del genotipo Am/Af.

Los pacientes 1,3 y 8 según el registro (porporcionado por el INSPI) de ingreso hacia las clínicas de las provincias Esmeraldas, Orellana y Los Rios, respectivamente nos muestra que fueron ingresadas antes del resto de pacientes de las *Tabla 8.* Según el árbol filogenético de forma radial **Figura 3.7.1.1**[b] muestra que las cepas virales: CW06, CW065 y CW090 que corresponden a la región de CprM forma un nuevo aparente sublinaje que divergen del sublinaje A,B y C del genotipo V (Am/Af). Lo que se corrobora con el árbol filogenético **Figura 3.7.1.2**[c] reconstruido con la región de Envoltura; en estos, las cepas virales: CW350, CW355 y CW362 pertenecen a los mismos pacientes (1,3 y 8) y también forma un clado diferente de los sublinajes A, B, C y D del genotipo V (Am/Af) del DENV-1.

3.7.2 Dengue Serotipo 2 (DENV-2)

Las muestras virales detectados como DENV-2 fueron aislados en Manabí, Los Ríos, Santa Elena, Guayas y Azuay entre los años 2012-2014.
Las 21 cepas aisladas pertenecieron en su mayoría a la región Costa (95% costa y 5% sierra) y fueron aislados durante los años 2012-2014. Estas cepas se identificaron que pertenece al genotipo American/Asian que contiene aislados de Brasil, Venezuela, Colombia, México y Paraguay. Esta identificación en el árbol filogenético usando método de Máxima Verosimilitud (Nótese en *Fig 3.7.2.1*).

Para todos los aislados (cepas) en Ecuador del Denv-2, aparentemente existe una divergencia formado una clado con las cepas con otros países de Sudamérica. Las cepas CW369E (E) y CW094 (CprM) provenientes de Manta y aislados en el 2012 que no fueron parte de este clado (Posterior >70% usando la región de E y >90 usando la región de CprM) mostrándose esto en el árbol usando la región de envoltura y cápside con pre-membrana (*Figura 3.7.2.1 a y b*). Según el blasteo de estas cepas mencionadas existen una similitud con cepas provenientes de Colombia, Venezuela Nicaragua de los años anteriores a este estudio (99% Identidad según blast.ncbi.nlm.nih.gov.

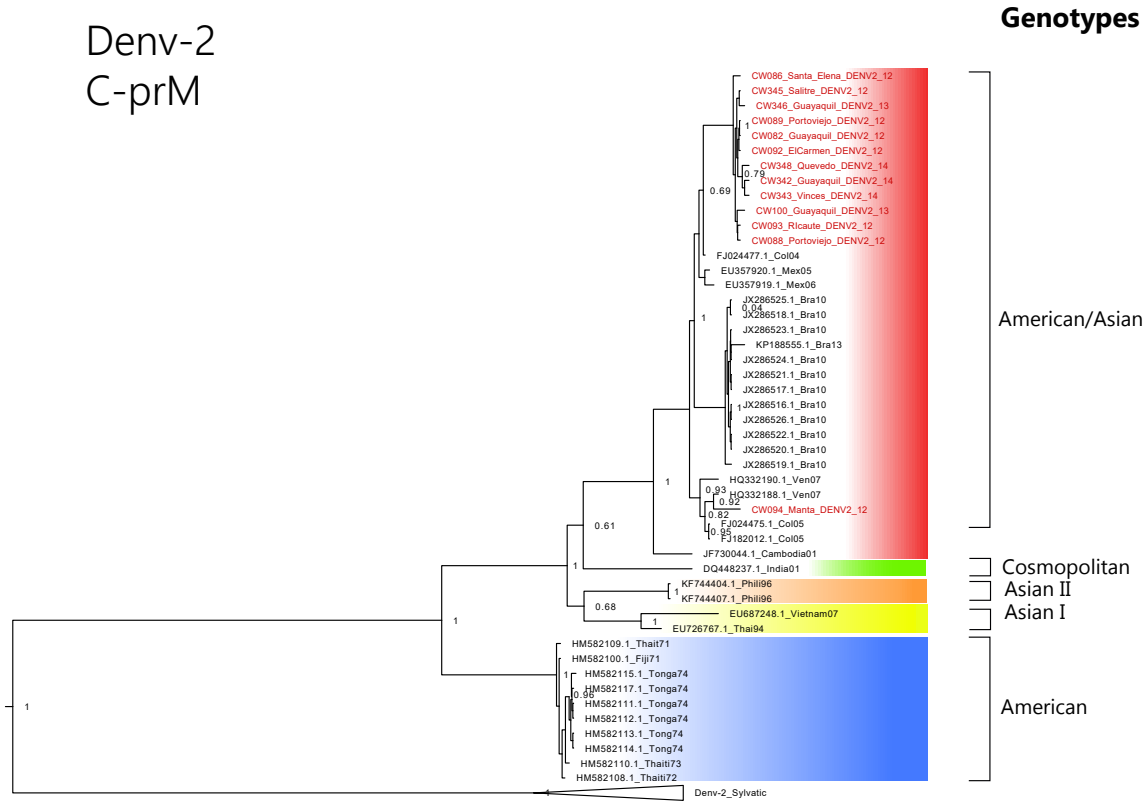
3.7.2.1 Región de Cápside y precursora de membrana (C-prM)

Usando la región C-prM, se reconfirma que las cepas virales aisladas en Ecuador pertenecen al genotipo Am/As

La mayoría de las secuencias (n=13) fueron obtenidas en la región costa (Manabí, Los Ríos, Guayas, Santa Elena) y solo una en la sierra, en la provincia del Azuay; estos se aislaron en los años 2012 al 2014.

Estas secuencias poseen entre 353-423 nucleótidos y tuvieron el 99-98% de identidad a todos los aislados registrados en el GenBank. Los más cercanos fueron de cepas de Colombia, Venezuela y Nicaragua y algunos de México.

La secuencia CW348 proveniente de las provincias de Los Ríos (2014) fue la de menor identidad con respecto a las cepas reportados en GenBank (Identidad 98%), los más cercanos fueron cepas aislados en Colombia (2004), Venezuela (2003-2006), México (2010) y Nicaragua (2005-2006).



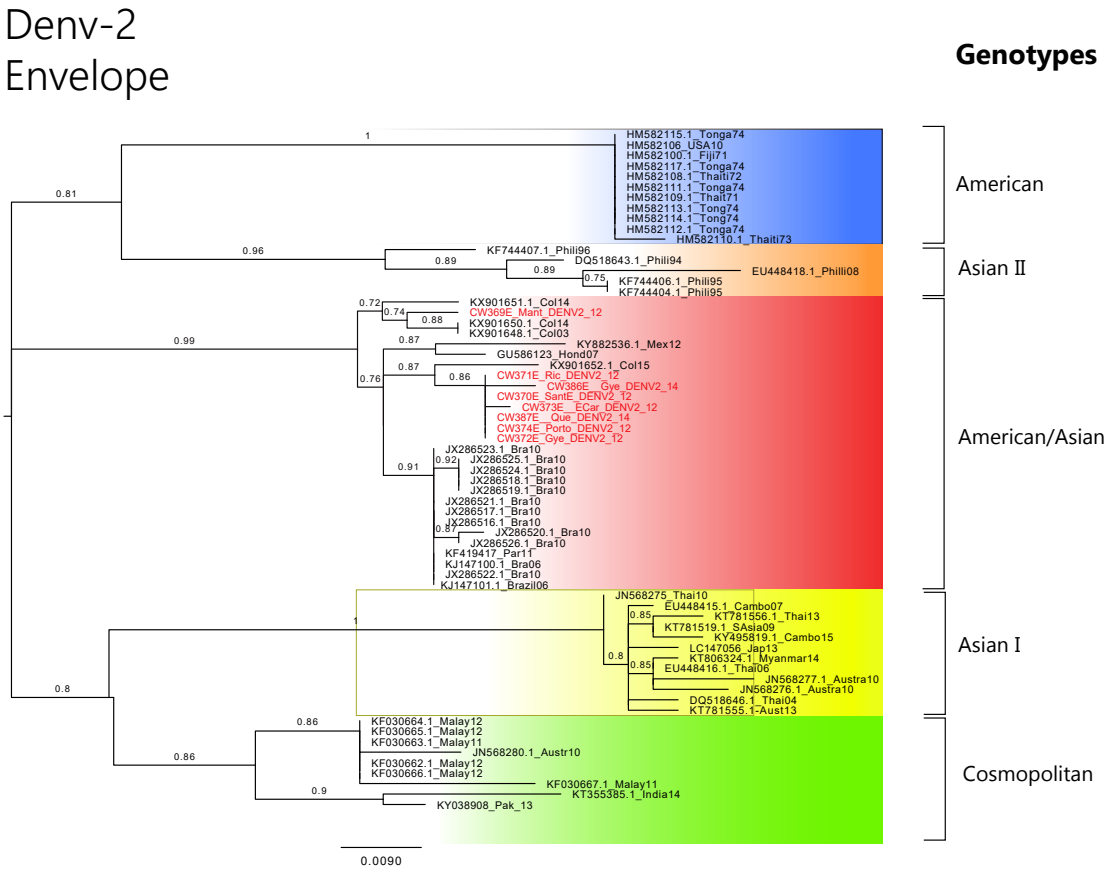
7.Figura 3.7.2.1 Árbol filogenético de Máxima Verosimilitud con cepas DENV-2 CprM, alineamiento realizado en MEGA7 con método de ClustalW, modelo de sustitución GTR+G4+I. 30 millones de generaciones. Secuencias ecuatorianas analizadas en este estudio están con color de fuente rojo.

Se puedo notar que todas las cepas en excepción al CW094 (Manta 12) divergente del resto de cepas de Sudamérica dentro del Genotipo Americano/Asiático aisladas del 2000 al 2010.

3.7.2.2 Región de Envoltura (E)

Las secuencias con región viral de envoltura se alinearon y se compararon con 58 secuencias de diferentes genotipos, lo que resulto para esta región que las secuencias de virus de dengue aislados en Ecuador se agruparan dentro del clado del genotipo Americano/Asiático.

Estas secuencias de nucleótidos (n=8) tuvieron el 99-98% de identidad a todos los aislados registrados en el GenBank. Los más cercanos fueron de cepas de



8.Figura 3.7.2.2. Árbol filogenético de Máxima Verosimilitud construido mediante el editor gráfico de alineación de secuencia múltiples SEAVIEW usando PhyML. Modelo de sustitución GTR con una tasa de variación por sitio de categoría 4 y con un número de 1000 replicaciones

A diferencia del uso de la región CprM de la **Figura 3.7.2.1** , para la reconstrucción de este árbol se alineo con secuencias más actuales, sin embargo forman nuevamente un clado que diverge del resto de Sudamérica.

		DENV-2				
Pacientes	Region Viral		Genero	Edad	Provincia	Ingreso
	Cprm	E				
1	CW094	CW369	Maculino	15	Manta	Enero-2012
1	CW093	CW371	Maculino	11	Los Rios	Enero-2012
2	CW086	CW370	Femenino	7	Santa Elena	Febrero-2012

Tabla 9. Información de pacientes cuyas secuencias virales originan la nueva divergencia en el genotipo Am/As al resto de Sudamérica (Color amarillo divergente de todas las cepas ecuatorianas)

3.7.3 Dengue Serotipo 3 (DENV-3)

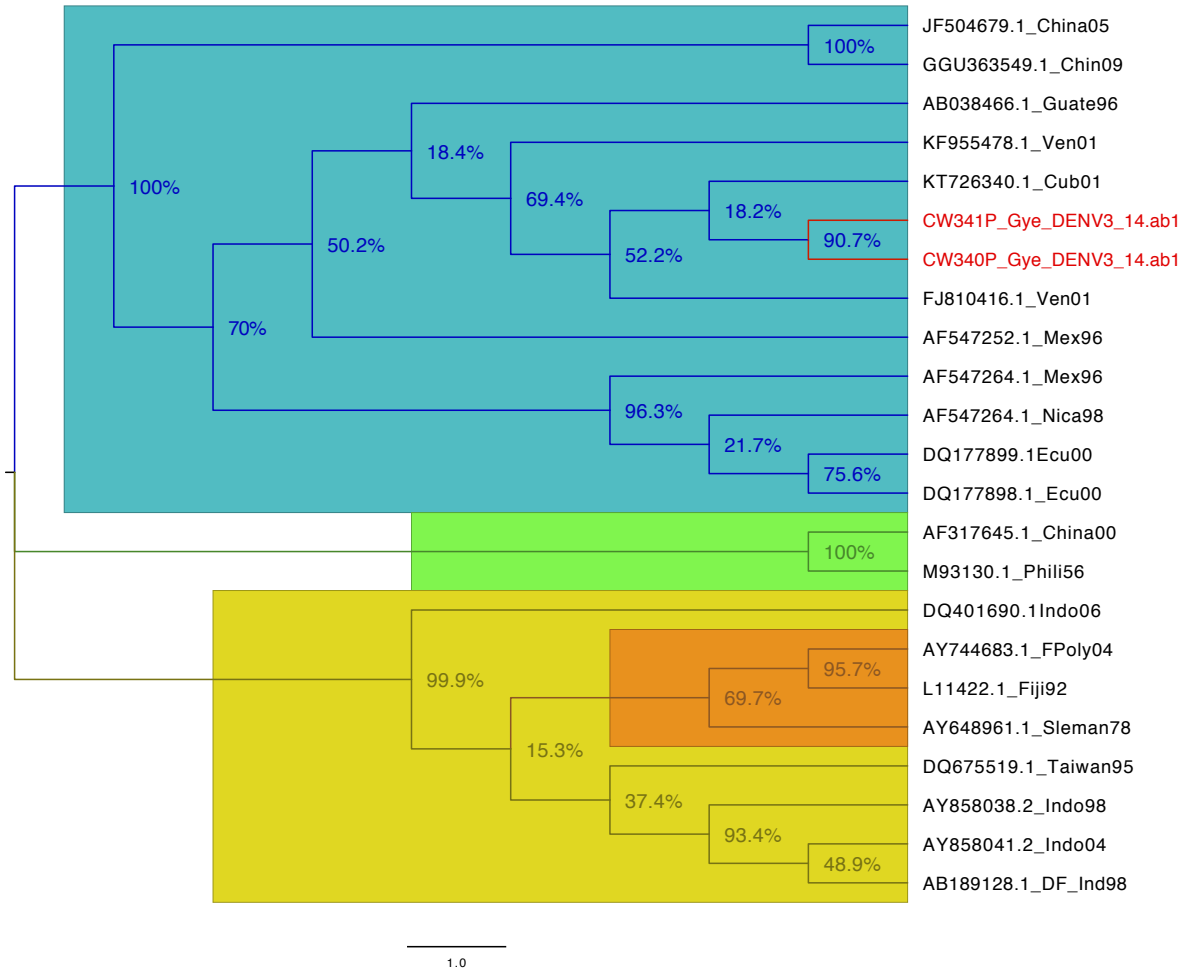
Las muestras virales detectados como DENV-3 fueron aislados únicamente en el año 2014, siendo esta fecha cuando surge este serotipo luego de 6 años, ya que se reportó en diciembre del 2008.

3.7.3.1 Región de Cápside y precursora de membrana (C-prM)

Las secuencias ecuatorianas que se tomaron para la construcción del árbol filogenético DENV-3 con la región C-prM provienen de la provincia del Guayas; estas fueron aisladas en el año 2014.

Este año es crucial para este serotipo, ya que, luego de 6 años de ausencia emerge y al parecer, en la ciudad de Guayaquil. La cepa CW340 y CW341 fue aislada de un niño de 15 años de edad.

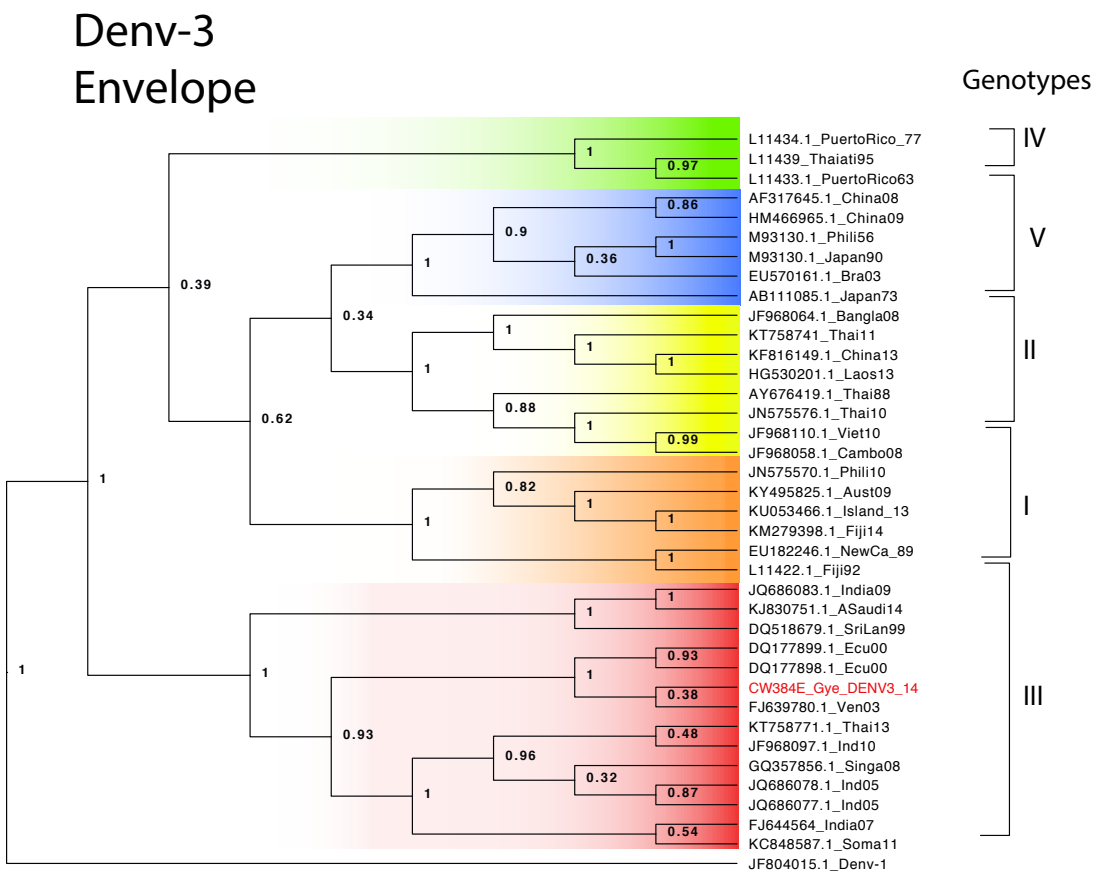
Estas muestras se alinearon con secuencias de México, Cuba, Guatemala, Nicaragua y Venezuela aislados en años anteriores del estudio, estas secuencias de referencia forman el clado del genotipo III, la cual, nuestras muestras se alinearon.



9.Figura 3.7.3.1 Árbol filogenético construido mediante de Test de Neighbor-Joining con un numero de 1000 replicaciones, se aplicó un modelo se sustitución de Taruma-Nei y un tratamiento de datos de eliminación por pares; todas las posiciones de codones fueron seleccionados y rango de sitios seleccionados fueron uniformes.

3.7.3.2 Región de Envoltura (E)

La cepa aislada en la provincia del Guayas fue usada para corroborar el genotipado de las secuencias del DENV-3, agrupado con las cepas aislada del genotipo II donde se alinean a secuencias de Venezuela aislados de 2001-2007, Puerto Rico 200-2005, Peru 2002 al 2007, Colombia y México 2002- 2003



10.Figura 3.7.3.2 Árbol filogenético de Máxima Verosimilitud con cepas DENV-3 con región E; alineamiento realizado en MEGA7 con método de ClustalW, modelo de sustitución GTR+G4+I y un modelo estricto de reloj molecular. Se corrieron 30 millones de generaciones. Secuencias ecuatorianas analizadas en este estudio están con color de fuente rojo.

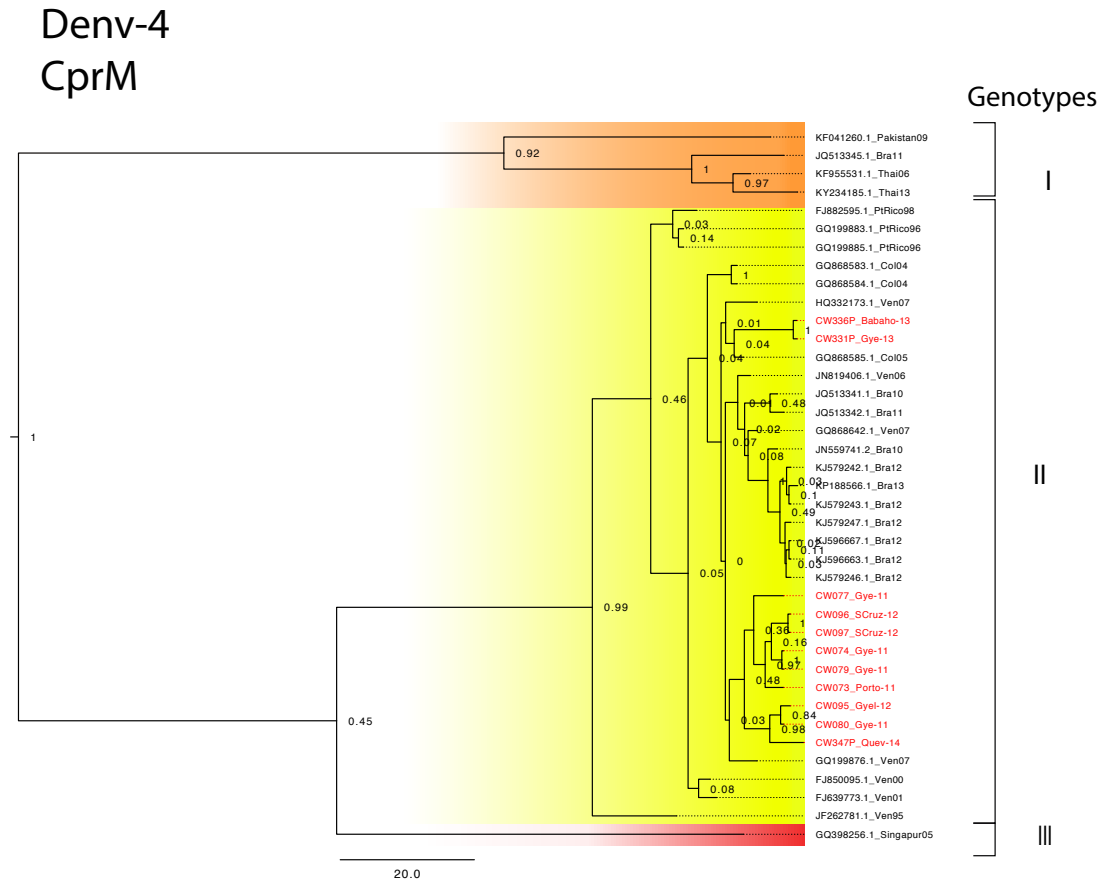
3.7.4 Dengue Serotipo 4 (DENV-4)

Las muestras virales detectados como DENV-4 fueron aislados en las provincias del Guayas, Los Ríos y Galápagos desde el 2011 al 2014. Es decir, estuvieron circulando cepas virales del DENV-4 en todos los años de estudios, incluyendo en el año de mayor brote de casos infecciosos (2012) en el país, con excepción al 2010 en la que también tuvimos altos número de casos reportados tanto para dengue clásico como hemorrágico.

3.7.4.1 Región de Cápside y precursora de membrana (C-prM)

La alineación de secuencias de 256 nucleótidos correspondientes a la región parcial de C-prM del DENV, corroboran la circulación del Genotipo II del DENV-4 en Ecuador para el periodo de años ya mencionado.
De modo particular para este árbol (*Figura 3.7.4.2*), las cepas del año 2013 aisladas en las provincias del Guayas y Los Ríos fueron agregadas y tuvieron como resultado que se agruparon en clado diferentes al resto de cepas aisladas en años anteriores; Para este nuevo periodo, las cepas se agruparon junto con muestras aislada de Venezuela

3.7.4.2

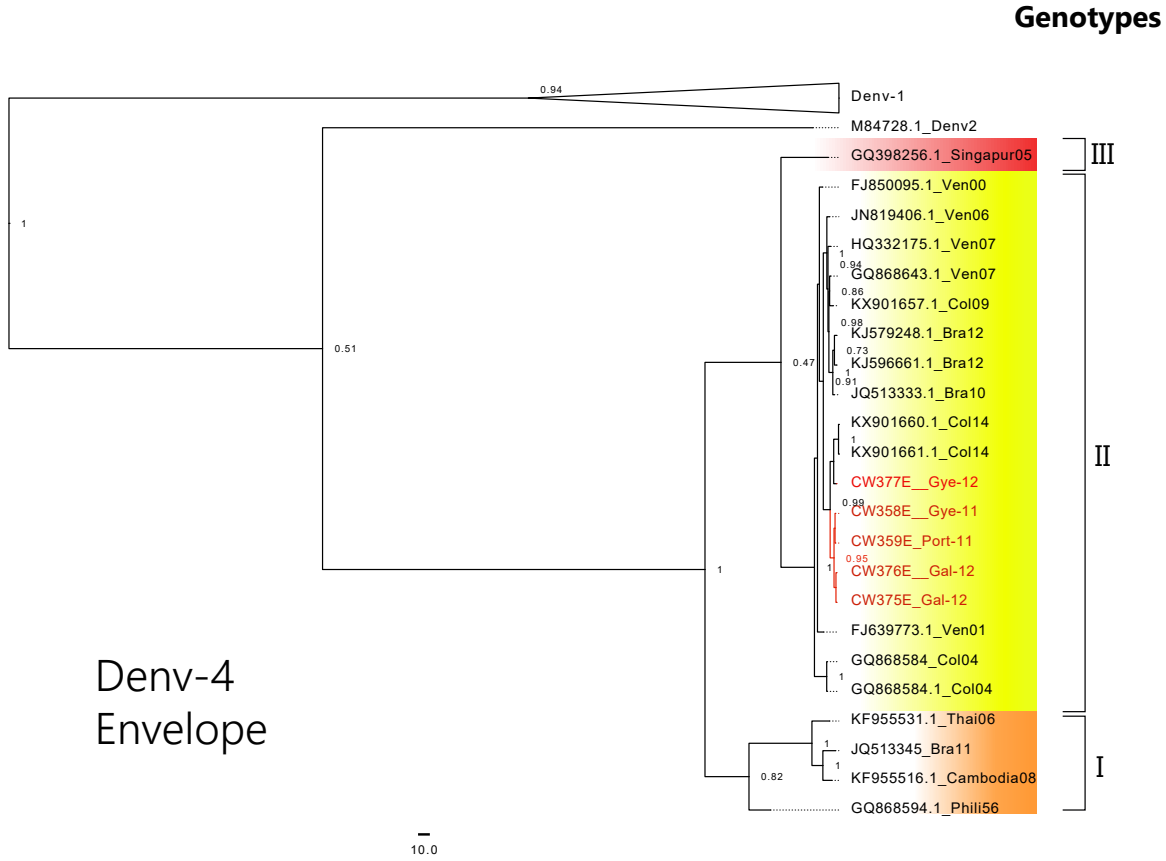


11.Figura 3.7.4.1 Árbol filogenético de Máxima Verosimilitud con cepas DENV-4 con región CprM; alineamiento con método de ClustalW, modelo de sustitución GTR+G10+I y un modelo relajado no correlacionado exponencial (uced) para el reloj molecular y con una previa distribución expotencial. Bayesian Skyline con número de grupos 5 con modelo por partes constantes. Se corrieron 20 millones de generaciones. Secuencias ecuatorianas analizadas en este estudio están con color de fuente rojo.

Región de Envoltura (E)

Mediante el uso de secuencias que están sujetas a proceso de selección, como la región de envoltura (E), se muestra que ha circulado en el país desde el 2011 hasta el 2014, el genotipo II del DENV-4, agrupándose con cepas virales aislados en Venezuela, Brasil, Colombia correspondientes al año 2000 al 2012.
Aparentemente las cepas ecuatorianas del 2011 al 2012 divergen en un mismo clado, junto con secuencias aisladas de nuestro país fronterizo Colombia, siendo la cuidad

de Guayaquil, el sitio donde, según la *Figura 3.7.4.1ª,* emergió luego de un año de ausencia.



12.Figura 3.7.4.2 Árbol filogenético de Máxima Verosimilitud con cepas DENV-4 con región E; alineamiento realizado en MEGA7 con método de ClustalW, modelo de sustitución GTR+G10+I y un modelo relajado exponencial para el reloj molecular. Bayesian Skyline con número de grupos 10 con modelo por partes constantes. Se corrieron 20 millones de generaciones. Secuencias ecuatorianas analizadas en este estudio están con color de fuente rojo.

Discusiones

En la primera infección del DENV, de cualquiera que sea el serotipo, hay pocas probabilidades de desarrollar DHF, a menos que sea el serotipo 2 [63] . No así a la segunda infección por DENV a la que se le atribuyen las complicaciones típicas del DHF, principalmente de los genotipos asiáticos de los serotipos 2 y 3, con menor frecuencia el serotipo 4 y casi nunca del serotipo 1.[28] Esta última afirmación, sin embargo, podría ser equívoca al momento de asociar un serotipo específico con los casos de dengue grave y los brotes que han ocurrido en nuestro país; en el año 2010 solo hubo un serotipo circulante (DENV1) y en 2009 hubo dos serotipos circulantes (DENV1, DENV4) los casos de DHF apuntan a DENV1 ya sea en primera o segunda infección en el año 2010.

La edad y género del paciente son otros factores a considerar[64] y en nuestro resultaron los porcentajes más altos en edades comprendidas entre 11 y 20 años con una media de 17 años en comparación a otros estudios donde la media resultó de 31 años y el grupo de mayor riesgo entre 20 y 40 años de edad[34].

En cuanto a género se encontró paridad entre hombres y mujeres con un 51% y un 49% respectivamente, lo que también se diferencia a los porcentajes observados de 60% y 40%[35]. Por otro lado, la tendencia de brotes epidémicos cada 2 o 3 años es un patrón que también se ha observado en Colombia [45], mientras que en la mayoría de Sudamérica se han manifestado brotes cada 3 a 5 años. En el caso de Ecuador observamos que no todos los años donde ocurrieron epidemias de dengue necesariamente hubo brotes de DHF, lo que sugiere que el dengue no tiene un patrón establecido ni de epidemias ni de periodos de tiempo. Además, en los años donde hemos tenido brotes de DHF a nivel panamericano, los serotipos que han circulado en el país no han sido los mismos que en ningún otro país de la región.

En cuanto a la temperatura como principal factor climático de la enfermedad, la relación podría deberse a un aumento en el número de infectados de la enfermedad[65]. Aparte de esto, las altas temperaturas contribuyen no solo a la probabilidad de infección sino al desarrollo del mosquito vector (*A. aegypti*), a su fecundidad, a la sobrevivencia y a la transmisión de la enfermedad.[66] Esto concuerda con las provincias que tienen mayor incidencia de dengue y su relación con las altas temperaturas como se observó en el gráfico 3.3.1.

A lo que respecta la enfermedad del dengue severo, los factores de riesgo para desarrollarla, incluyen en primer lugar, infecciones previas con algún serotipo[67][68][69], y en nuestro estudio se encontró que no en todos los años circularon los cuatro serotipos a la vez, por lo tanto, los causantes de dichos brotes se direccionan hacia unos poco serotipos, como en el caso de brote epidemiológico causado en el 2010 en el Ecuador, solo el genotipo Am/Af de DENV-1 y el genotipo II del DENV-4 circularon antes y durante dicho brote. En segundo lugar depende de la cepa del virus que infecta[70][71] y en Ecuador entre los años 2009 y 2012 circularon cepas de genotipo Americano/Africano para el serotipo 1 (Denv-1), el genotipo Americano/Asiático para el serotipo 2 (DENV-2), el genotipo III para el serotipo 3 (DENV-3), y el genotipo II del serotipo II (DENV-4) este último serotipo en particular no había circulado antes de los 5 años de estudio, recién empieza a circular en el año 2014. Otras cepas aisladas en el país se clasificaron en el genotipo II para el serotipo 4 (Denv-4) y que ha surgido en todos los años de estudio con excepción al 2010 donde se reportó mayor casos del dengue hemorrágica y clásico, y de estos tuvieron prevalencia el genotipo Americano/Africano del DENV-1 y el genotipo II del DENV-4 en los brotes de dengue hemorrágico; la enfermedad del dengue también depende del fondo genético[72][73] junto con el estado nutricional[74][75] que no se hizo referencia en este estudio de cada individuo de la población, por estas razones presentamos una análisis de toda la filogenia y epidemiologia de las cepas aisladas en el país, sin hacer responsables de forma exclusiva a estas cepas aisladas de provocar dengue severo ni hemorrágico.

4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Conclusiones

1.El dengue es una enfermedad muy compleja que relaciona la biología del vector, su dispersión, resistencia, factores ambientales, los serotipos más infectantes e incluso condiciones socioeconómicas por lo que resulta de extrema complejidad atribuirle una causa fija.

2. Las provincias con mayor promedio de temperatura ambiental, principalmente pertenecientes a la costa, son más propensas a adquirir la infección por dengue debido a que ésta es una condición climática favorable para el desarrollo y transmisión de la enfermedad. Debemos considerar, sin embargo, que como cualquier otro factor climático, la temperatura presenta variabilidad por lo cual no puede ser considerado un factor determinante pero sí un factor de influencia.

3. La situación filogenética del dengue en el Ecuador establecida con cepas aisladas desde del 2009 hasta el 2014 muestra que han circulado los genotipo Americano/Africano (Denv-1), Americano/Asiático (Denv-2), Genotipo III (Denv-3) y Genotipo II (Denv-4), siendo el serotipo 1 con mayor divergencia genética dentro del mismo genotipo y que junto con el DENV-4 circularon en Ecuador en periodos de mas altos brote de dengue.

4. La nueva divergencia que se dio en el genotipo Americano/Africano del serotipo 1, tienen aparentemente 3 orígenes, que surgen desde el Norte del País, en la provincia de Esmeraldas en el 2009, al Oeste, en la provincia de Orellana en el 2010 y finalmente en la provincia de Los Ríos en el 2012, coincidiendo con el año de mayor número de casos registrados en dichas provincias.

5. La nueva divergencia dado en el genotipo Am/As del DENV-2 muestra un aparente origen en la provincia de Santa Elena, junto con una cepa viral aislada en Manta cuya secuencia no se alinea con ninguna cepa aisladas en el país y que coincide con el año con mayor número de brotes de dengue clásico y hemorrágico del Ecuador jamás antes visto.

Recomendaciones

1. Se recomienda que se haga un mayor énfasis a la aparente nueva sublinaje que se ha forma dentro del genotipo V (Am/Af) del serotipo 1 (Denv-1) en el Ecuador, relacionándolo con altos casos de dengue clásico y hemorrágico causado en su provincia de origen en comparación el resto del país.
2. En estudios posteriores se debería analizar las razones por las cuales el DENV1 tiene una mayor probabilidad de causar el cuadro agravado de la enfermedad en nuestro país.
3. Se debería además proporcionar más datos sobre los pacientes infectados con dengue, sobre todo si se trata de una primera o segunda infección cuando se reportan cuadros se dengue hemorrágico.

BIBLIOGRAFÍA

[1] R. Wash y C. D. Soria, “True Blood: dengue virus evolution”, *Nat. Rev. Microbiol.*, vol. 13, núm. 11, pp. 662–662, oct. 2015.

[2] R. Chen y N. Vasilakis, “Dengue — Quo tu et quo vadis?”, *Viruses*, vol. 3, núm. 9, pp. 1562–1608, sep. 2011.

[3] S. Bhatt *et al.*, “The global distribution and burden of dengue”, *Nature*, vol. 496, núm. 7446, pp. 504–507, abr. 2013.

[4] M. G. Guzman *et al.*, “Dengue: a continuing global threat”, *Nat. Rev. Microbiol.*, vol. 8, núm. 12, pp. S7–S16, dic. 2010.

[5] “OMS | Enfermedades transmitidas por vectores”, *WHO*. [En línea]. Disponible en: http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs387/es/index2.html. [Consultado: 16-dic-2017].

[6] E. C. Holmes, “The phylogeography of human viruses”, *Mol. Ecol.*, vol. 13, núm. 4, pp. 745–756, abr. 2004.

[7] “holmes2004.pdf”. .

[8] G. M. Jenkins, A. Rambaut, O. G. Pybus, y E. C. Holmes, “Rates of Molecular Evolution in RNA Viruses: A Quantitative Phylogenetic Analysis”, *J. Mol. Evol.*, vol. 54, núm. 2, pp. 156–165, feb. 2002.

[9] E. C. Holmes, “The phylogeography of human viruses”, *Mol. Ecol.*, vol. 13, núm. 4, pp. 745–756, abr. 2004.

[10] E. C. Holmes, “Simposio XIV. The Evolution and Epidemiology of Dengue Virus”, *Salud Pública México*, vol. 49, pp. 296–300, 2007.

[11] M. Bollati *et al.*, “Structure and functionality in flavivirus NS-proteins: Perspectives for drug design”, *Antiviral Res.*, vol. 87, núm. 2, pp. 125–148, ago. 2010.

[12] T. Chakraborty y H. Babcock, *Dengue fever and other hemorrhagic viruses*. New York, NY: Chelsea House, 2008.

[13] M. S. Mustafa, V. Rasotgi, S. Jain, y V. Gupta, “Discovery of fifth serotype of dengue virus (DENV-5): A new public health dilemma in dengue control”, *Med. J. Armed Forces India*, vol. 71, núm. 1, pp. 67–70, ene. 2015.

[14] L. Y. Jiang *et al.*, “Molecular characterization and genotype shift of dengue virus strains between 2001 and 2014 in Guangzhou”, *Epidemiol. Infect.*, vol. 145, núm. 04, pp. 760–765, mar. 2017.

[15] M. OhAinle *et al.*, “Dynamics of Dengue Disease Severity Determined by the Interplay Between Viral Genetics and Serotype-Specific Immunity”, *Sci. Transl. Med.*, vol. 3, núm. 114, p. 114ra128, dic. 2011.

[16] A. T. Bäck y Å. Lundkvist, “Dengue viruses – an overview”, *Infect. Ecol. Epidemiol.*, vol. 3, ago. 2013.

[17] World Health Organization, *Dengue Haemorrhagic Fever: Diagnosis, Treatment, Prevention and Control*, 2a ed. Geneva: WHO Library Catloguing in Publication Data, 1997.

[18] Ministerio de Salud de la Nación, República Argentina, “Diagnóstico de Dengue. Guía para el Equipo de Salud”. 2015.
[19] C. P. Simmons, J. J. Farrar, V. V. C. Nguyen, y B. Wills, “Current concepts dengue”, 2012.
[20] D. C. Q. Gil, J. E. O. Benítez, y M. M. Gutiérrez, “Competencia vectorial: consideraciones entomológicas y su influencia sobre la epidemiología del Dengue”, *Iatreia*, vol. 23, núm. 2, pp. 146–156, 2012.
[21] R. Rico-Hesse, “Molecular evolution and distribution of dengue viruses type 1 and 2 in nature”, *Virology*, vol. 174, núm. 2, pp. 479–493, 1990.
[22] A. P. Goncalvez *et al.*, “Diversity and Evolution of the Envelope Gene of Dengue Virus Type 1”, *Virology*, vol. 303, núm. 1, pp. 110–119, nov. 2002.
[23] S. S. Twiddy *et al.*, “Phylogenetic Relationships and Differential Selection Pressures among Genotypes of Dengue-2 Virus”, *Virology*, vol. 298, núm. 1, pp. 63–72, jun. 2002.
[24] R. S. Lanciotti, J. G. Lewis, D. J. Gubler, y D. W. Trent, “Molecular evolution and epidemiology of dengue-3 viruses”, *J. Gen. Virol.*, vol. 75, núm. 1, pp. 65–75, 1994.
[25] J. M. G. Araújo, R. M. R. Nogueira, H. G. Schatzmayr, P. M. de A. Zanotto, y G. Bello, “Phylogeography and evolutionary history of dengue virus type 3”, *Infect. Genet. Evol.*, vol. 9, núm. 4, pp. 716–725, jul. 2009.
[26] R. S. Lanciotti, D. J. Gubler, y D. W. Trent, “Molecular evolution and phylogeny of dengue-4 viruses.”, *J. Gen. Virol.*, vol. 78, núm. 9, pp. 2279–2284, 1997.
[27] E. Wang *et al.*, “Evolutionary Relationships of Endemic/Epidemic and Sylvatic Dengue Viruses”, *J. Virol.*, vol. 74, núm. 7, pp. 3227–3234, abr. 2000.
[28] Instituto Superior de Ciencias Médicas de la Habana, “Dengue”. 2006.
[29] Organización Mundial de la Salud, “Dengue y Dengue Grave”, abril del 2017.
[30] S. Bhatt *et al.*, “The global distribution and burden of dengue”, *Nature*, vol. 496, núm. 7446, pp. 504–507, abr. 2013.
[31] Organización Panamericana de la Salud, “Situación del dengue en la región de las Américas”.
[32] D. J. Gubler, “Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever”, *Clin. Microbiol. Rev.*, vol. 11, núm. 3, pp. 480–496, jul. 1998.
[33] Organización Panamericana de la Salud, “Dengue: Datos, Mapas y Estadística”, 2012.
[34] Y. Pereira, M. Samudio, A. Ojeda, y Á. Cabello, “Seroprevalencia de la infección por dengue en un distrito del Chaco Paraguayo: Estudio poblacional”, *Rev. Chil. Infectol.*, vol. 32, núm. 6, pp. 618–627, 2015.
[35] C. Martínez de Cuellar, “Epidemiological characteristics of dengue in children under 15 years old in Paraguay. 2008 - 2013”, *Rev. Inst. Med. Trop.*, vol. 11, núm. 2, pp. 4–14, dic. 2016.

[36] Kintiziger K., Stanek D., L. Stark, y G. Gallagher, “LocallyAcquired Dengue-KeyWest,Florida,2009-2010”, *Cent. Dis. Control Prev.*, vol. 59(19), núm. Weekly, pp. 577–581, 2010.
[37] M. Nattiello, V. Ritacco, M. . Morales, B. Picollo, E. Dinerstein, y D. Enria, “Indigenous Dengue Fever, Buenos Aires, Argentina”, *Emerg. Infect. Dis.*, vol. 14(9), pp. 1498–1499, 2008.
[38] “Dirección Nacional de Vigilancia Epidemiológica – Ministerio de Salud Pública”. [En línea]. Disponible en: http://www.salud.gob.ec/direccion-nacional-de-vigilancia-epidemiologica/. [Consultado: 16-dic-2017].
[39] R. Mostorino, A. Rosas, V. Gutiérrez, E. Anaya, M. Cobos, y M. García, “Manifestaciones clínicas y distribución geográfica de los serotipos del dengue en el Perú-año 2001”, *Rev. Peru. Med. Exp. Salud Pública*, vol. 19, núm. 4, pp. 171–180, 2002.
[40] “Historia del Dengue - EcuRed”. [En línea]. Disponible en: https://www.ecured.cu/Historia_del_Dengue. [Consultado: 06-ene-2018].
[41] J. L. San Martín, O. Brathwaite Dick, J. del Diego, R. H. Montoya, G. H. Dayan, y B. Zambrano, “The History of Dengue Outbreaks in the Americas”, *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, vol. 87, núm. 4, pp. 584–593, oct. 2012.
[42] Ministerio de Salud. Presidencia de la Nación, “PLAN NACIONAL DE PREVENCIÓN Y CONTROL DEL DENGUE EN ARGENTINA”. [En línea]. Disponible en: http://slideplayer.es/slide/4211168/. [Consultado: 09-feb-2018].
[43] Unidad de Epidemiología. Programa de control de enfermedades transmitidas por vectores, “SITUACIÓN EPIDEMIOLÓGICA DE DENGUE BOLIVIA”, 2013. [En línea]. Disponible en: http://slideplayer.es/slide/1042940/. [Consultado: 09-feb-2018].
[44] P. Chaparro-Narváez, W. León-Quevedo, y C. A. Castañeda-Orjuela, “Comportamiento de la mortalidad por dengue en Colombia entre 1985 y 2012”, *Biomédica*, vol. 36, núm. Sup2, pp. 125–134, ago. 2016.
[45] “SALAS ESPECIALIZADA S DE LA COMISIÓN REVISORA DIRECCIÓN DE MEDICAMENTOS Y PRODUCTOS BIOLÓGICOS VACUNA CONTRA EL VIRUS DEL DENGUE”. [En línea]. Disponible en: http://slideplayer.es/slide/10234387/. [Consultado: 09-feb-2018].
[46] J. J. Real-Cotto, M. E. Regato Arrata, V. E. Burgos Yépez, y E. T. Jurado Cobeña, “Evolución del virus dengue en el Ecuador. Período 2000 a 2015”, *An. Fac. Med.*, vol. 78, núm. 1, p. 29, may 2017.
[47] E. Mamani *et al.*, “Circulación de un linaje diferente del virus dengue 2 genotipo América / Asia en la región amazónica de Perú, 2010”, *Rev. Peru. Med. Exp. Salud Pública*, vol. 28, pp. 72–77, mar. 2011.
[48] C. Cabezas, V. Fiestas, M. García-Mendoza, M. Palomino, E. Mamani, y F. Donaires, “Dengue en el Perú: a un cuarto de siglo de su reemergencia”, *Rev. Peru. Med. Exp. Salud Pública*, vol. 32, núm. 1, pp. 146–156, abr. 2015.

[49] Lic. Julio C. Zambrano, “Sección de Inmunoserología Viral INHRR”. [En línea]. Disponible en: http://slideplayer.es/slide/3986573/. [Consultado: 09-feb-2018].

[50] J. Ramos-Castañeda, F. Barreto dos Santos, R. Martínez-Vega, J. M. Galvão de Araujo, G. Joint, y E. Sarti, “Dengue in Latin America: Systematic Review of Molecular Epidemiological Trends”, *PLoS Negl. Trop. Dis.*, vol. 11, núm. 1, ene. 2017.

[51] Susana Caillou, “DENGUE”, Agosto-2014. [En línea]. Disponible en: http://slideplayer.es/slide/6651513/.

[52] “ANUARIO DE VIGILANCIA EPIDEMIOLÓGICA 1994 - 2016 ENFERMEDADES TRASMITIDAS POR VECTORES”, *Tableau Software*. [En línea]. Disponible en: https://public.tableau.com/views/EnfermeddaesTropicales_vectoriales-2014/ANUARIO?%3Aembed=y&%3AshowVizHome=no&%3Adisplay_count=y&%3Adisplay_static_image=y&%3AbootstrapWhenNotified=true. [Consultado: 18-dic-2017].

[53] M. Regato *et al.*, “Phylogenetic analysis of the NS5 gene of dengue viruses isolated in Ecuador”, *Virus Res.*, vol. 132, núm. 1–2, pp. 197–200, mar. 2008.

[54] “The burden of dengue fever and chikungunya in southern coastal Ecuador: Epidemiology, clinical presentation, and phylogenetics from the first two years of a prospective study - Buscar con Google”. [En línea]. Disponible en: https://www.google.com/search?client=safari&rls=en&q=The+burden+of+dengue+fever+and+chikungunya+in+southern+coastal+Ecuador:+Epidemiology,+clinical+presentation,+and+phylogenetics+from+the+first+two+years+of+a+prospective+study&ie=UTF-8&oe=UTF-8. [Consultado: 22-feb-2018].

[55] M. A. López-Latorre y M. Neira, “Influencia del cambio climático en la biología de Aedes aegypti (Diptera: Culicidae) mosquito transmisor de arbovirosis humanas”, *Rev. Ecuat. Med. Cienc. Biol.*, vol. 37, núm. 2, 2016.

[56] et Thompson J. al, “The CLUSTAL_X windows inter- face: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools”, *Nucleic Acids Res.*, vol. 25, pp. 4876–4882, 1997.

[57] F. Sjatha, Y. Takizawa, A. Yamanaka, y E. Konishi, “Phylogenetic analysis of dengue virus types 1 and 3 isolated in Jakarta, Indonesia in 1988”, *Infect. Genet. Evol.*, vol. 12, núm. 8, pp. 1938–1943, dic. 2012.

[58] A. Drummond y A. Rambaut, “BEAST: Bayesian evolu- tionary analysis by sampling trees”, *BMC Evol. Biol.*, vol. 7, p. 214, 2007.

[59] L. B. Figueiredo *et al.*, “Dengue virus 3 genotype 1 associated with dengue fever and dengue hemorrhagic fever, Brazil”, *Emerg. Infect. Dis.*, vol. 14, núm. 2, p. 314, 2008.

[60] C. R. Vicente *et al.*, “First phylogenetic analysis of dengue virus serotype 4 circulating in Espírito Santo state, Brazil, in 2013 and 2014”, *Epidemiol. Amp Infect.*, pp. 1–7, nov. 2017.
[61] Cristina Coello, “Ecuador tiene la letalidad más baja por dengue de la región”, *Redacción Médica*, de enero-2017. [En línea]. Disponible en: https://www.redaccionmedica.ec/secciones/salud-publica/ecuador-tiene-la-letalidad-m-s-baja-por-dengue-de-la-regi-n-89387. [Consultado: 10-feb-2018].
[62] Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases y World Health Organization, Eds., *Dengue: guidelines for diagnosis, treatment, prevention, and control*, New ed. Geneva: TDR : World Health Organization, 2009.
[63] D. Pizarro, “Dengue, dengue haemorrhagic fever”, *Acta Pediátrica Costarric.*, vol. 21, núm. 1, pp. 08–17, 2009.
[64] K. L. Anders *et al.*, “Epidemiological factors associated with dengue shock syndrome and mortality in hospitalized dengue patients in Ho Chi Minh City, Vietnam”, *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, vol. 84, núm. 1, pp. 127–134, ene. 2011.
[65] Barrera R, Amador M and MacKay A. 2011, *Population Dynamics of Aedes aegypti and Dengue as Influenced by Weather and Human Behavior in San Juan, Puerto Rico.* .
[66] Erin A. Mordecai1*, Jeremy M. Cohen2, Michelle V. Evans3, Prithvi Gudapati1, Leah, R. Johnson2,4, Catherine A. Lippi5, Kerri Miazgowicz6, Courtney C. Murdock3,6, Jason, R. Rohr2, Sadie J. Ryan5,7,8,9, Van Savage10,11, Marta S. Shocket1,12, Anna Stewart Ibarra13, y Matthew B. Thomas14, Daniel P. Weikel15, “Detecting the impact of temperature on transmission of Zika, dengue, and chikungunya using mechanistic models”, abril 2017.
[67] S. B. Halstead y P. Simasthien, “Observations related to the pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. II. Antigenic and biologic properties of dengue viruses and their association with disease response in the host.”, *Yale J. Biol. Med.*, vol. 42, núm. 5, pp. 276–292, abr. 1970.
[68] W. Dejnirattisai *et al.*, “Cross-Reacting AntibodiesEnhance Dengue Virus Infection in Humans”, *Science*, vol. 328, pp. 745–748, 2010.
[69] W.-K. Wang *et al.*, “High levels of plasma dengue viral load during defervescence in patients with dengue hemorrhagic fever: implications for pathogenesis”, *Virology*, vol. 305, núm. 2, pp. 330–338, ene. 2003.
[70] D. W. Vaughn *et al.*, “Dengue viremia titer, antibody response pattern, and virus serotype correlate with disease severity”, *J. Infect. Dis.*, vol. 181, núm. 1, pp. 2–9, ene. 2000.
[71] J. M. G. de Araújo *et al.*, “Quantification of dengue virus type 3 RNA in fatal and non-fatal cases in Brazil, 2002”, *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, vol. 103, núm. 9, pp. 952–954, sep. 2009.

[72] J. R. Bravo, M. G. Guzmán, y G. P. Kouri, “Why dengue haemorrhagic fever in Cuba? 1. Individual risk factors for dengue haemorrhagic fever/dengue shock syndrome (DHF/DSS)”, *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, vol. 81, núm. 5, pp. 816–820, 1987.
[73] R. Appanna, S. Ponnampalavanar, L. Lum Chai See, y S. D. Sekaran, “Susceptible and protective HLA class 1 alleles against dengue fever and dengue hemorrhagic fever patients in a Malaysian population”, *PloS One*, vol. 5, núm. 9, sep. 2010.
[74] U. Thisyakorn y S. Nimmannitya, “Nutritional status of children with dengue hemorrhagic fever”, *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.*, vol. 16, núm. 2, pp. 295–297, feb. 1993.
[75] S. Kalayanarooj y S. Nimmannitya, “Is dengue severity related to nutritional status?”, *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health*, vol. 36, núm. 2, pp. 378–384, mar. 2005.

ANEXOS

Factor temperatura

Región	Provincia	2009	2010	2011	2012
AMAZONIA	Morona Santiago	22	22,2	21,7	21,7
	Napo	17,1	16,4	15,8	15,8
	Orellana	25,5	25,7	25,3	25,3
	Pastaza	21,4	21,8	21,3	21,2
	Sucumbíos	23	24,2	23,8	23,7
	Zamora Chinchipe	23	23,9	23,5	*23,5
COSTA	El Oro	23	24,6	24,3	25,2
	Esmeraldas	25	25,3	25,4	25,8
	Guayas	25,7	25,6	25,1	25,5
	Los Ríos	25,8	25,5	25,6	24,2
	Manabí	25,2	25,4	25,4	25,4
	Santa Elena	*24,1	23,8	24,2	24,3
	Santo Domingo				
SIERRA	Azuay	12,8	14,2	14,4	13,6
	Bolívar	13,7	16	15,7	13,5
	Cañar	17	18,7	17	17
	Carchi	13,9	14,9	13	14,6
	Chimborazo	13,5	14,4	12,9	11
	Cotopaxi	15,2	15,5	15	14,9
	Imbabura	14,2	16,2	15,9	13,7
	Loja	18,9	18,8	18,5	18,6
	Pichincha	16,7	17,2	16,3	16
	Tungurahua	13,8	14,1	13,9	13,7
INSULAR	Galápagos	24,3	23,3	23,9	24,4

Tabla 10.Temperaturas medias de todas las provincias durante los años 2009 a 2012. *Promedio de los otros años por falta de datos

Factor Precipitación

Región	Provincia	2009	2010	2011	2012
AMAZONIA	Morona Santiago	2915,3	2506,5	2780,8	2906,2
	Napo	843,5	3121,9	2932,8	2984,2
	Orellana	3350,4	2594,8	2948	3481
	Pastaza	4734,1	4031,2	4158,8	4470,3
	Sucumbíos	4692	4827,5	5412,8	5637,9
	Zamora Chinchipe	2211	2107	2082,1	2103,4
COSTA	El Oro	1621,4	1038,4	825,4	460,4
	Esmeraldas	875	2222,3	1804,2	3163,6
	Guayas	904,3	1067,5	655,5	1764,7
	Los Ríos	1304	2241	1465,5	2777,3
	Manabí	663,3	1137,6	748,8	974,6
	Santa Elena	149,23	137,8	46,2	263,7
	Santo Domingo				
SIERRA	Azuay	857,2	942,6	1286,3	1035,9
	Bolívar	715	1137,6	840,4	970,7
	Cañar	1000,7	1449,3	1190,5	1389
	Carchi	456,4	907,6	1197,4	652
	Chimborazo	399,9	567,3	872,5	520
	Cotopaxi	1516,5	1811,4	1406	1543,1
	Imbabura	871,7	1515,2	1673,8	825,3
	Loja	1122,7	988,6	1124	1311,3
	Pichincha	1226,9	1536,2	1459	1344,5
	Tungurahua	542,3	832	826,4	613,9
INSULAR	Galápagos	379,5	599,8	1041,3	939,5

Tabla 11. Precipitaciones de todas las provincias durante los años 2009 a 2012