

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL

Facultad de Ciencias de la Vida

Implementación del diagnóstico de los serotipos del virus del dengue mediante PCR con transcriptasa inversa en tiempo real (RT-qPCR).

PROYECTO INTEGRADOR

Previo la obtención del Título de:

Biólogo

Presentado por:

Remigio Ernesto Arteaga Tamayo

GUAYAQUIL - ECUADOR

Año: 2021 - 2022

DEDICATORIA

El presente proyecto está dedicado a familiares y amigos quienes me han apoyado a lo largo del proyecto, especialmente a mis padres quienes se esfuerzan y me apoyan a diario para que pueda cumplir mis metas y objetivos.

AGRADECIMIENTOS

Mi más sincero agradecimiento al equipo de trabajo del Laboratorio para Investigaciones Biomédicas de ESPOL, por su apoyo incondicional en el desarrollo de un proyecto de alta calidad. Especial mención al Blgo. Ricardo Correa, MSc. Mariuxi Mirabá y Ph.D. Washington B. Cárdenas por brindarme su sabiduría, enseñanza y guía a lo largo del proceso.

DECLARACIÓN EXPRESA

"Los derechos de titularidad y explotación, me corresponde conforme al reglamento de propiedad intelectual de la institución; Remigio Ernesto Arteaga Tamayo y doy mi 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"


Remigio Arteaga Tamayo

EVALUADORES

.....
MSc. Diego Gallardo

PROFESOR DE LA MATERIA

.....
Ph.D. Washington B. Cárdenas

PROFESOR TUTOR

RESUMEN

El dengue es una de las enfermedades transmitidas por vectores con gran número de casos alrededor del mundo. Se divide en cuatro serotipos, con una variación del 30% del genoma entre ellos y cada uno exhibe en mayor proporción síntomas propios del dengue. Pruebas de antígenos o anticuerpos para detección de dengue no pueden discernir serotipos y presentan deficiente sensibilidad en diagnóstico temprano. Pruebas moleculares superan estas barreras, sin embargo, son altamente costosas. Por ello, ¿Es posible implementar un método costo-efectivo para la detección de serotipos virales? El objetivo del proyecto es desarrollar un protocolo estandarizado de serotipado de dengue (I-IV) basado en multiplex de PCR tiempo real (RT-qPCR) para implementación de paneles de diagnóstico local y seguimiento epidemiológico. Se realizó análisis bioinformático de iniciadores y sondas de los serotipos, así como pruebas de optimización y calibración de RT-qPCR para diagnóstico de serotipos en una sola reacción. La PCR multiplex de tres serotipos (I, II y IV) demostró la misma sensibilidad y especificidad que se obtendría con sus respectivas detecciones individuales. El enfoque multiplex supone un ahorro para el análisis de 32 muestras, resultando en \$64,2 mientras la detección individual supone un gasto de \$181,19. Los resultados de calibración y optimización de PCR multiplex, junto al análisis económico indican que el protocolo empleado obtuvo una prueba costo – efectiva para la detección de serotipos virales, cuyos lineamientos y normas se pueden extender para PCR multiplex de otros virus.

Palabras Clave: Serotipos de dengue, Multiplex, Dengue, PCR en tiempo real, RT – qPCR.

ABSTRACT

Dengue is one of the vector-borne diseases with numerous cases around the world. It is divided into four serotypes, with a variation of 30% of the genome between them, and each one exhibits a significant proportion of dengue symptoms. Antigen or antibody tests for dengue detection cannot discern serotypes and have poor sensitivity in early diagnosis. Molecular tests overcome these barriers; however, they are expensive. Therefore, is it possible to implement a cost-effective method for viral serotypes detection? The project objective is to develop a standardized dengue serotyping protocol (I-IV) based on multiplex real-time PCR (RT-qPCR) for local diagnostic panels and epidemiological monitoring implementation. Bioinformatic analysis of serotype primers and probes was performed, as well as RT-qPCR optimization and calibration tests for serotype diagnosis in a single reaction. The multiplex PCR of three serotypes (I, II, and IV) showed the same sensitivity and specificity that would be obtained with their respective individual detections. The multiplex approach saves for the analysis of 32 samples, resulting in \$64.2 while the individual detection costs \$181.19. The results of multiplex PCR calibration and optimization, together with the economic analysis, indicate that the protocol used obtained a cost-effective test for viral serotypes detection, whose guidelines and standards can be extended to multiplex PCR of other viruses.

Keywords: dengue serotypes, multiplex, dengue, real-time PCR, RT - qPCR.

ÍNDICE GENERAL

EVALUADORES.....	5
RESUMEN.....	I
<i>ABSTRACT</i>	II
ÍNDICE GENERAL.....	III
ABREVIATURAS	V
SIMBOLOGÍA	VI
ÍNDICE DE FIGURAS.....	VII
ÍNDICE DE TABLAS	VIII
ÍNDICE DE ECUACIONES	IX
CAPÍTULO 1	10
1. Introducción	10
1.1 Descripción del problema	10
1.2 Justificación del problema.....	11
1.3 Objetivos.....	12
1.3.1 Objetivo General	12
1.3.2 Objetivos Específicos	12
1.4 Marco teórico	12
1.4.1 Virus del Dengue y su transmisión	12
1.4.2 Sintomatología del dengue y asociación a serotipos virales	13
1.4.3 Estrategias de detección del virus del dengue	14
1.4.4 PCR, PCR en tiempo real y relevancia en serotipado del dengue	15
CAPÍTULO 2.....	17
2. Metodología	17
2.1 Análisis bioinformático de los iniciadores.....	17

2.2	Controles positivos de cada serotipo y curva estándar singleplex.....	18
2.3	Ensayos RT-qPCR multiplex	19
2.4	Análisis económico del desarrollo del multiplex.....	19
CAPÍTULO 3.....		20
3.	Resultados y análisis	20
3.1	Análisis bioinformático	20
3.2	Generación de ARN sintético.....	21
3.3	Curva Estándar y ensayos PCR en tiempo real (RT - qPCR).....	22
3.4	Ensayos de optimización para calibración multiplex.....	23
3.5	Análisis económico del multiplex	26
CAPÍTULO 4.....		28
4.	Conclusiones Y Recomendaciones.....	28
4.1	Conclusiones	28
4.2	Recomendaciones	28
BIBLIOGRAFÍA.....		29
APÉNDICES		33
APÉNDICE A		34

ABREVIATURAS

PCR	Polymerase chain reaction
RT-qPCR	Quantitative reverse transcription PCR
ESPOL	Escuela Superior Politécnica del Litoral
ARN	Ácido ribonucleico
ADN	Ácido desoxirribonucleico
DENV	Dengue virus
ADNc	ADN complementario
Ct	Cycle threshold

SIMBOLOGÍA

Kb	Kilobase
pb	Pares de bases
ng	Nanogramo
ul	Microlitro
uM	Micromolar

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 3.1 Evaluación del ADN plasmídico con iniciadores específicos para cada serotipo. D1 (serotipo 1), D2 (serotipo 2), D3 (serotipo 3), D4 (serotipo 4).....	21
Figura 3.2 Curva estándar serotipo 3, tipo de experimento: rápido (“Fast”).....	22
Figura 3.3 Curva estándar serotipo 3, tipo de experimento: estandar (“Standard”) ...	23
Figura 3.4 Ensayo multiplex de los serotipos 1, 2 y 4 (concentración de iniciador 0,4 uM y sonda 0,125 uM por cada serotipo).....	24
Figura 3.5 Ensayo multiplex de los serotipos 1, 2 y 4 con ARNs sintético similar orden magnitud (dilución 3 para serotipo 1 y dilución 4 para serotipo 2 y 4)	25
Figura 3.6 Ensayo multiplex de los serotipos 1, 2 y 4 con ARNs sintético similar orden magnitud (dilución 7 para serotipo 1 y dilución 8 para serotipo 2 y 4)	25
Figura 3.7 Comparación de una prueba de detección multiplex vs prueba de detección individual, bajo mismas condiciones	26

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 2.1 Iniciadores y sondas provistos por el Laboratorio para investigaciones Biomédicas.	17
Tabla 3.1 Número de secuencias que presentaban discordancia (“mismatch”) respecto al iniciador / sonda.	20
Tabla 3.2 Número de copias virales de ARN sintético y sus diluciones para ensayos de PCR tiempo real (RT- qPCR).....	21
Tabla 3.3 Materiales empleados en prueba RT- qPCR.	27

ÍNDICE DE ECUACIONES

Ecuación 2.1 Número de Copias inicial ARN	18
---	----

CAPÍTULO 1

1. INTRODUCCIÓN

Ecuador se encuentra en la zona del trópico, caracterizada por dos temporadas bien marcadas: invierno y verano. Las condiciones ambientales han sido adecuadas para el desarrollo de diversas enfermedades transmitidas por vectores, tales como: Dengue, Zika, Chikungunya (*Aedes aegypti* y *Aedes albopictus*) (Ministerio de Salud Pública, 2021) y fiebre amarilla (*Aedes spp.* y *Haemagogus spp.*) (World Health Organization, 2019). Desde su detección en 1988, el dengue tiene el mayor número de casos cada año en comparación a otras enfermedades vectoriales (Ministerio de Salud Pública, 2012). La explosión demográfica ha propiciado la transmisión de la enfermedad por el *Aedes aegypti*, ya que provee sitios adecuados para reproducción y por tanto mayor producción de larvas, así como supervivencia de adultos dentro de las casas, donde las poblaciones suburbanas se ven más afectadas debido a escasa sanidad, hacinamiento y escasa infraestructura (Kolimenakis et al., 2021). Esto se ve evidenciado especialmente en la ciudad de Guayaquil perteneciente a la provincia del Guayas, donde existe población con déficit de viviendas, asentamientos irregulares que conllevan a contaminación y condiciones sanitarias inadecuadas, entre otras (Ministerio de Desarrollo Urbano y Vivienda, 2015). Si bien Guayas no es la ciudad con mayor número de casos de dengue por cada 100.000 habitantes, en el último año registro mayor número de casos (Ministerio de Salud Pública, 2021), dando mayor apertura a un brote epidémico. La infección por el virus del dengue no solo es necesidad local, debido a que aproximadamente 100 millones de personas adquieren la enfermedad en el mundo (Centers for Disease Control and Prevention, 2021). Por ello, surge la necesidad de desarrollar métodos, sensibles y costo-efectivos para la detección temprana del virus y sus serotipos, así como seguimiento epidemiológico (Kabir, Zilouchian, Younas, & Asghar, 2021).

1.1 Descripción del problema

La enfermedad del dengue puede ser causada por cualquiera de los serotipos, donde Ecuador ha presentado los cuatro serotipos en circulación a lo largo de los años desde su llegada en los 80 (Márquez et al., 2018). Los métodos para determinar dengue en los pacientes se basan en pruebas serológicas,

específicamente en la detección de anticuerpos. Una desventaja de estas pruebas es que no ofrece un diagnóstico temprano de la enfermedad (De Paula & Lopes, 2004). En Ecuador, no se suele diagnosticar los serotipos de dengue, pese a que existe evidencia científica que recalcan la importancia epidemiológica y sintomatologías asociadas a serotipos virales del dengue. A nivel mundial, los ensayos principales para el diagnóstico de los serotipos son RT-PCR y RT-qPCR debido a su especificidad y detección temprana con 100% de eficiencia, no obstante, el costo de cada ensayo representa un costo elevado. De esta manera, gana suma importancia optimizar y desarrollar protocolos para diagnóstico de serotipos de dengue, debido a que la enfermedad del dengue presenta alta prevalencia hasta la actualidad, en contraste a otros arbovirus, como: zika, chikungunya y fiebre amarilla cuyos casos se han reducido notablemente desde el 2017 (Ministerio de Salud Pública, 2021).

1.2 Justificación del problema

Ecuador es un país susceptible a la entrada de los arbovirus desde otros países (Maljkovic Berry et al., 2020), donde diversos modelos han evidenciado que las variables climáticas propias del país presentan un pequeño pero significativo incremento en el número de casos de la enfermedad (Sippy et al., 2019). En Ecuador, ensayos multiplex son importados tales como detección de dengue, zika y chikungunya (Díaz, 2016), no obstante ensayos para la detección de serotipos de dengue no son importados ni desarrollados. Investigaciones actuales en otros países, han demostrado gran eficacia en detección de serotipos de dengue empleando multiplex RT-qPCR (Balasubramanian et al., 2020), (Kim & Hwang, 2020), validando que la necesidad desarrollar metodologías para un diagnóstico costo-efectivo del dengue y sus serotipos para supervivencia y control epidemiológico (Mardekian & Roberts, 2015) en el Ecuador.

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo General

Desarrollar un protocolo estandarizado de serotipado de dengue (I-IV) basado en multiplex de PCR tiempo real (RT-qPCR) para la implementación de paneles de diagnóstico local y seguimiento epidemiológico.

1.3.2 Objetivos Específicos

- Analizar los iniciadores y sondas propuestos por el laboratorio para investigaciones biomédicas con secuencias genéticas de dengue reportadas entre 2010-2021 mediante el uso de herramientas bioinformáticas para determinación de especificidad.
- Generar curva estándar detección individual (singleplex) de un serotipo para determinación de concentraciones óptimas para ensayos multiplex y límites de detección.
- Comparar los valores Ct obtenidos de diferentes concentraciones de iniciadores y sondas en RT-qPCR multiplex con ensayos de detección individual para calibración del serotipado en una sola reacción.

1.4 Marco teórico

1.4.1 Virus del Dengue y su transmisión

El virus del dengue pertenece a la familia flaviviridae, género flavivirus (Kuno, Chang, Tsuchiya, Karabatsos, & Cropp, 1998) siendo un virus de ARN en sentido positivo (sgRNA (+)) con un tamaño de genoma de 11 Kb y variación de 30% de poliproteína entre los cuatro serotipos: serotipo 1 (DENV-1), serotipo 2 (DENV-2), serotipo 3 (DENV-3), serotipo 4 (DENV-4) (Holmes, 2007). A lo largo de su genoma, presenta 3 proteínas estructurales (glicoproteínas de la Capside(C), Membrana (M) y envoltura (E)) y siete proteínas no estructurales (NS1, NS2, NS2B, NS3, NS4A, NS4B y NS5) (Guzman et al., 2010). La partícula viral ingresa a la célula vía endocitosis, el genoma es liberado por acidificación de la vesícula endocítica y traducido directamente en poliproteína, que será procesada por proteasas virales y del huésped hasta convertirse en virión maduro infeccioso y salir por exocitosis (Mukhopadhyay, Kuhn, & Rossmann, 2005).

La transmisión del virus ocurre hacia el ser humano través de la picadura de un vector (*Aedes aegypti* y *Aedes albopictus*) por medio de transmisión horizontal. Por otra parte, los mosquitos parentales pueden transferir el virus a la descendencia, por transmisión vertical (Ferreira-de-Lima & Lima-Camara, 2018). El mosquito *Aedes aegypti* tiene amplia distribución a lo largo de áreas urbanas y *Aedes albopictus* predomina en áreas rurales, no obstante, ambos pueden encontrarse en zonas periurbanas (Rey & Lounibos, 2015). El ciclo de vida del mosquito *Aedes aegypti* depende de los sumideros disponibles. De manera general, sumideros a nivel de comunidad tendrán más éxito en reproducción del mosquito que en las viviendas, sin embargo, se observó alto éxito reproductivo en sumideros peridomiciliarios (macetas, jarrones, llantas, huecos en superficie y árboles, etc.) que intradomiciliario (González, Gamboa, Parafán, Suárez, & Montoya, 2007).

1.4.2 Sintomatología del dengue y asociación a serotipos virales

La enfermedad del dengue, provocada por cualquiera de los serotipos, ha sido clasificada en tres grupos dependiendo de la severidad de los síntomas: Fiebre indiferenciada, fiebre del dengue (DF) y fiebre hemorrágica del dengue (DHF) (World Health Organization, 1997). Posteriormente, se subdividió la fiebre hemorrágica del dengue en cuatro subgrupos, de los cuales el 3 y 4 corresponden al síndrome de shock de dengue (DSS). Una posible enfermedad de dengue presenta: náuseas, sarpullido, vómito, dolor, disminución de glóbulos blancos, mientras que signos de alarma de dengue son: dolor abdominal, sangrado de mucosa, fatiga, vómito persistente, incremento en hematocrito mientras disminuyen las plaquetas. La fase severa de la enfermedad del dengue corresponde a: extravasación del plasma, sangrado severo y afección a órganos (hígado, corazón, sistema nervioso central, entre otros) (World Health Organization, 2009). La fiebre junto con los primeros síntomas de la enfermedad va desde 2 a 7 días luego de incubación del virus, donde a partir del tercer día pueden entrar en fase crítica donde la enfermedad puede agravarse (en los días 3 – 8 luego de incubación). Luego de la fase crítica, viene el periodo de

recuperación del paciente (24 a 48 horas) donde los valores en sangre vuelven a la normalidad (World Health Organization, 2012).

En los últimos años diversos artículos científicos han correlacionado ciertos síntomas y riesgos con algún serotipo específico. Se ha demostrado que pacientes con DENV-1 tenían mayor riesgo de contraer dengue severo y fiebre hemorrágica, mientras pacientes con DENV-2 mostraron menor riesgo de contraer fiebre hemorrágica (Yung et al., 2015). Además, pacientes con DENV-1 presentaron ojos rojos y mayor carga viral, en contraste a pacientes con DENV-2, quienes se asociaron con dolor de articulaciones y bajo conteo de plaquetas. Por otra parte, pacientes con DENV-2 exhibieron 3.1 veces más de síntomas neurológicos que otros serotipos. Pacientes con DENV-3 exhibieron 2.8 veces más ardor al orinar y fiebre mayor a 39 grados que otros serotipos. Pacientes con DENV-4 presentaron en mayor proporción síntomas característicos de dengue: dolor de cabeza, náusea y sarpullido, mientras serotipo de DENV-1 lo presentó en menor proporción a otros serotipos (Khan et al., 2020). Con respecto a manifestaciones gastrointestinales (diarrea y náuseas), DENV-4 suele presentar baja prevalencia, en contraste a DENV-3 con alta prevalencia. Pacientes con DENV-1 suelen presentar dolor de huesos en comparación a otros serotipos (Halsey et al., 2012).

1.4.3 Estrategias de detección del virus del dengue

La sintomatología de la enfermedad del dengue puede ser fácilmente confundido con alguna otra enfermedad causada por arbovirus (zika, fiebre amarilla, chikungunya). Para el diagnóstico efectivo del dengue se han desarrollado metodologías basadas en detección de anticuerpos, antígenos y ácido nucleico viral en suero, plasma y tejidos. La detección de ácido nucleico viral comprende de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y secuencia de ácido nucleico (NASBA), detección de antígenos se da por ensayos de inmunoenzimático de adsorción (ELISA) y dot blot de proteínas estructurales (cápside y membrana) y no estructurales (NS1), mientras pruebas serológicas comprenden detección de anticuerpos (ELISA para detección de: IgG, IgM y IgA, ensayo de hemaglutinación (HI) y pruebas hematológicas) (World Health Organization, 2009). Dentro de los diagnósticos serológicos, las pruebas ELISA son las más utilizadas en la

detección del dengue, no obstante, no permite dilucidar el serotipo. Por otra parte, la RT-PCR ha mostrado alta eficiencia para diagnóstico, en cualquier día de infección (De Paula & Lopes, 2004). Esto se corroboró al evaluar el valor predictivo positivo y negativo con RT-PCR resultando en 100% eficacia en cualquier día de infección, mientras positivo en pruebas serológicas de detección de IgM e IgG solo fue efectivo a partir del día 6 de enfermedad (Barkham, Chung, Tang, & Ooi, 2006).

1.4.4 PCR, PCR en tiempo real y relevancia en serotipado del dengue

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) representa una de las herramientas moleculares más utilizadas y ampliamente distribuida, desde su invención a mediados de los años 80 (Saiki et al., 1988). De manera general, todos los tipos de PCR tienen como objetivo la amplificación una región o secuencia a partir de un molde ADNc (transcripción reversa de ARN) o ADN, donde el producto se denomina amplicón. Para la amplificación, debe pasar por tres pasos: Desnaturalización (la apertura de la cadena molde), Anillamiento (donde se pegarán los iniciadores (conocidos como “primers”) a las hebras de la cadena molde) y Extensión (mediante una polimerasa se añadirá los nucleótidos complementarios a la hebra molde), de esta manera se obtiene abundante número de amplicones, con un tamaño definido por los iniciadores a lo largo de varios ciclos repetitivos (Alves et al., 2009).

En la actualidad, existen diversos tipos y/o técnicas de PCR, no obstante, las más comunes son PCR punto final y PCR en tiempo real (qPCR). Una diferencia muy destacable es que la PCR punto final requiere otra metodología para determinar si se realizó con éxito la amplificación, siendo la electroforesis la más común, mientras la PCR tiempo real capta la fluorescencia emitida por una sonda, que nos ayudará a validar y cuantificar la amplificación en vivo a lo largo de los ciclos. Entre las sondas más utilizadas se encuentra SYBER Green y TaqMan (Alves et al., 2009). El tinte SYBER Green emite fluorescencia cuando se une al surco menor de la doble cadena, siendo excitado a una longitud de onda de 480nm, alcanzando la mayor emisión en el paso de extensión y cayendo en el paso de desnaturalización (Rodríguez-Lázaro & Hernández, 2014). Por otra parte, las

sondas TaqMan consisten en un oligonucleótido específico a la secuencia que se desea amplificar, que contiene un fluoróforo en el extremo 5' y una molécula inhibidora del fluoróforo en el extremo 3'. Durante la extensión, cuando la polimerasa llegue a la sonda, por actividad exonucleasa liberará el fluoróforo de su inhibidor, emitiendo la fluorescencia que será medida por el equipo de qPCR. La fluorescencia emitida dependerá del tinte que se use en la sonda, algunos ejemplos de emisión son: VIC (verde), FAM (azul), ROX (rojo), entre otros (Butler, 2012). Los tintes SYBER Green no requieren de un diseño de sonda, mientras las sondas TaqMan si requieren, no obstante, las sondas TaqMan se unen específicamente a la secuencia/región deseada, en tanto los tintes SYBER Green se pueden unir a dímeros o amplificaciones/productos no deseados (Marmioli & Maestri, 2007).

Para el estudio de virus de ARN, se suele emplear una variante de PCR tiempo real, denominada PCR tiempo real con transcriptasa inversa en tiempo real (RT-qPCR) la cual combina el proceso de transcripción inversa para producir ADN complementario a partir de molde de ARN y la PCR en tiempo real, mencionadas previamente. Esta herramienta ha mostrado gran éxito para la evaluación de diversas familias de virus como: flavivirus, paramyxovirus, retrovirus, papovavirus, coronavirus, entre otros (Mackay, Arden, & Nitsche, 2002). Además, la implementación de ensayo multiplex (amplificación de varias secuencias/regiones en un mismo tubo), en contraste al ensayo singleplex (amplificación de una secuencia/región por cada tubo), trajo ventajas a la capacidad de diagnóstico de PCR y disminución de costo por ensayos (Elnifro, Ashshi, Cooper, & Klapper, 2000).

CAPÍTULO 2

2. METODOLOGÍA

2.1 Análisis bioinformático de los iniciadores

Para el análisis de la especificidad de los iniciadores (“primers”) y sondas (“probes”) mostrados en la Tabla 2.1, se descargaron secuencias y alineamiento de la base de datos NCBI virus (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/labs/virus/vssi/#/>) de cada serotipo, especificando los parámetros: tamaño de la secuencia mayor a 10.000 kb, la fecha desde: 01/Enero/2010 hasta 03/Noviembre/2021, secuencia completa y separado por continente. Se obtuvieron 1224 secuencias en total: 430, 579, 113 y 102 secuencias entre todos los continentes correspondiendo al serotipo 1, 2, 3 y 4 respectivamente, evidenciados en el APÉNDICE A. Posteriormente en el programa bioinformático Geneious 8.1.9 (<https://www.geneious.com>) se analizó las alineaciones, a fin de eliminar secuencias que introduzcan brechas no significativas en la secuencia consenso. Finalmente, iniciadores y sondas fueron evaluados al contrastar todos los serotipos con la secuencia consenso del alineamiento por cada continente. (Leparc-Goffart et al., 2009).

Tabla 2.1 Iniciadores y sondas provistos por el Laboratorio para investigaciones Biomédicas

Código	Serotipo	Tipo de iniciador/ sonda	Tinte fluorescente (5')	Temperatura alineamiento (Tm)	Referencia
D1FLIB	DENV-1	Primer Forward	-----	54,8	Leparc-Goffart, 2009
D1RLIB	DENV-1	Primer Reverse	-----	60,0	Leparc-Goffart, 2009
D1PLIB	DENV-1	Probe	ROX	61,7	Leparc-Goffart, 2009*
D2FLIB	DENV-2	Primer Forward	-----	56,0	diseñado
D2RLIB	DENV-2	Primer Reverse	-----	58,0	Leparc-Goffart, 2009*
D2PLIB	DENV-2	Probe	HEX	66,3	Leparc-Goffart, 2009

D3FLIB	DENV-3	Primer Forward	-----	56,6	Leparc-Goffart, 2009
D3RLIB	DENV-3	Primer Reverse	-----	56,2	Leparc-Goffart, 2009
D3PLIB	DENV-3	Probe	FAM	62,2	Leparc-Goffart, 2009
D4FLIB	DENV-4	Primer Forward	-----	60,0	diseñado
D4RLIB	DENV-4	Primer Reverse	-----	60,0	diseñado
D4PLIB	DENV-4	Probe	FAM	62,3	diseñado

* son secuencias obtenidas de la publicación que han sido modificadas

2.2 Controles positivos de cada serotipo y curva estándar singleplex

Como paso previo al desarrollo de la curva estándar, se produjo ARN sintético a partir de muestras positivas de cada serotipo, verificadas por medio de PCR hemianidada. El flujo de trabajo para el desarrollo del ARN sintético consistió en: producción de ADNc a partir del ARN viral, ligación a un plásmido y amplificación en bacterias, recuperación del plásmido y transcripción a ARN sintético, proceso similar al descrito para obtención de ARN estándares (QIAGEN N.V., 2014).

El primer paso para el desarrollo de la curva estándar fue cuantificar la cantidad de ARN de cada serotipo en el Quantus™ Fluorometer. Se determinó las cantidades de copias de secuencia molde (“template”) de las concentraciones conocidas por la siguiente ecuación empleada en QIAGEN N.V. (2014).

Número de copias inicial ARN

$$= \frac{\text{Concentración de ARN } \left(\frac{g}{\mu l}\right) \times \text{Número de avogadro}}{\text{Longitud en nucleótidos del template (ARN sintético)} \times \text{Masa promedio bp de ARN}} \quad (2.1)$$

Simplificado en:

Número de copias inicial ARN

$$= \frac{\text{Concentración de ARN } \left(\frac{g}{\mu l}\right) \times (6.022 \times 10^{23})}{\text{Longitud en nucleótidos del template (ARN sintético)} \times 340}$$

Posteriormente se realizó diluciones seriadas, con factor 1:10 de la concentración conocida hasta ocho veces, para ser empleadas en la RT-qPCR con tres réplicas

basado en especificaciones del software utilizado para el análisis: QuantStudio™ Design and Analysis Desktop Software. Para determinar el ciclo umbral (Ct) de las diferentes concentraciones se utilizó el kit SuperScript™ III One-Step RT-PCR System with Platinum™ Taq DNA Polymerase (Catálogo ThermoFisher: 12574018) en el equipo QuantStudio™ 1 Real-Time PCR System. Por último, la gráfica y características de la recta fue obtenida por el software mencionado previamente.

2.3 Ensayos RT-qPCR multiplex

Basado en la curva estándar previa, los ensayos se realizaron en concentraciones que se encuentren en un valor umbral (Ct) mayor a 8 y menor a 35, empleando el kit y equipo PCR empleado previamente. La especificidad de los iniciadores y sonda de cada serotipo fue evaluada al enfrentar individualmente iniciadores y sonda frente a los cuatro ARN sintéticos de los serotipos.

Para la calibración del multiplex, se realizó empleando diversas concentraciones de sondas y evaluando los ciclos umbrales (Ct), considerando que deben ser similares entre ellos. Finalmente, se comparó la detección individual con la detección multiplex con respecto a un serotipo, con el objetivo de evaluar si hay interacciones inespecíficas en el multiplex.

2.4 Análisis económico del desarrollo del multiplex

Los valores y costos de cada implemento usado para la PCR tiempo real (RT-qPCR) fueron provistos por el Laboratorio para investigaciones biomédicas. Se procedió a comparar los costos por varias muestras entre pruebas de detección individual y detección multiplex para evidenciar la factibilidad y viabilidad económica del desarrollo de ensayos multiplex.

CAPÍTULO 3

3. RESULTADOS Y ANÁLISIS

3.1 Análisis bioinformático

El análisis bioinformático reveló que los iniciadores y sondas en su mayoría son específicos a las secuencias consenso del serotipo correspondiente. Ciertas secuencias en diversos continentes presentaron un nucleótido de diferencia (“mismatch”) a los iniciadores y sondas propuestos en el proyecto como se evidencia en la Tabla 3.1, no obstante, esto no representó problema para el anillamiento. Con respecto a las interacciones, serotipo 1, 2 y 4 no evidenciaron problemas de reacción cruzada (“cross-reaction”), sin embargo, el serotipo 2 y 3 si lo tuvieron. Una diferencia de dos nucleótidos en la sonda del serotipo 2 permite anillación al genoma del serotipo 3, y viceversa. Esta reacción cruzada se evaluó de forma experimental posteriormente.

Tabla 3.1 Número de secuencias que presentaban discordancia (“mismatch”) respecto al iniciador / sonda

Iniciador / sonda	Asia	Norteamérica	Sudamérica	Oceanía	África	Europa
D1FLIB	Ninguno	Ninguno	Ninguno	Ninguno	Ninguno	Ninguno
D1RLIB	Ninguno	Ninguno	Ninguno	Ninguno	Ninguno	Ninguno
D1PLIB	Ninguno	Ninguno	Ninguno	Ninguno	Ninguno	Ninguno
D2FLIB	48 de 456 (1*)	Ninguno	Ninguno	Ninguno	Ninguno	-----
D2RLIB	317 de 456 (1*)	Ninguno	Ninguno	1 de 10 (1*)	Ninguno	-----
D2PLIB	Ninguno	Ninguno	Ninguno	Ninguno	Ninguno	-----
D3FLIB	Ninguno	Ninguno	Ninguno	Ninguno	Ninguno	-----
D3RLIB	Ninguno	Ninguno	Ninguno	Ninguno	Ninguno	-----
D3PLIB	Ninguno	Ninguno	Ninguno	Ninguno	Ninguno	-----
D4FLIB	Ninguno	Ninguno	13 de 58 (1*)	Ninguno	Ninguno	-----
D4RLIB	Ninguno	Ninguno	43 de 58 (1*)	Ninguno	Ninguno	-----
D4PLIB	Ninguno	Ninguno	Ninguno	Ninguno	Ninguno	-----

1* = un solo mismatch con respecto a la secuencia.

3.2 Generación de ARN sintético

Se obtuvo el tamaño esperado al evaluar el ADN plasmídico producto de la ligación, con el objetivo de verificar que la región de interés para ARN sintético se encontraba en el plásmido por cada serotipo. Estos tamaños correspondieron a: serotipo 1 (150 pb), serotipo 2 (118 pb), serotipo 3 (85 pb) y serotipo 4 (101 pb), evidenciado en la Figura 3.1. Las concentraciones de ARN sintético obtenidas posterior a la retro transcripción corresponden a: serotipo 1 (14 ng/ul), serotipo 2 (146 ng/ul), serotipo 3 (55,1 ng/ul) y serotipo 4 (40,3 ng/ul). El número de copias virales obtenidas estuvo en un orden de magnitud entre 10^{10} y 10^{11} , con la mayor concentración del serotipo 3 y la menor concentración para el serotipo 1, un resumen del número de copia obtenido por serotipo y sus diluciones se muestran en la Tabla 3.2.

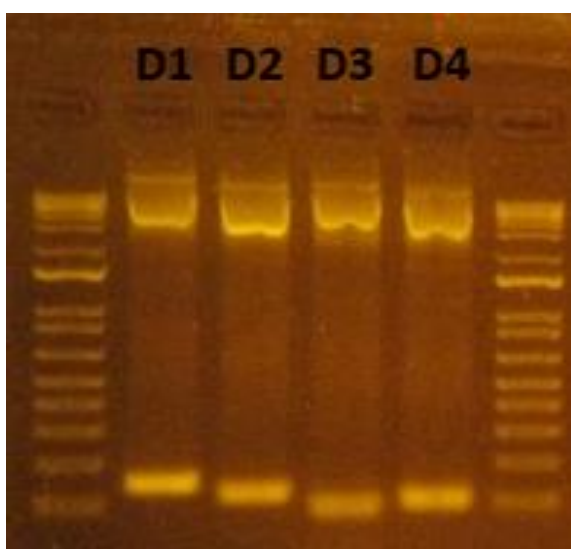


Figura 3.1 Evaluación del ADN plasmídico con iniciadores específicos para cada serotipo. D1 (serotipo 1), D2 (serotipo 2), D3 (serotipo 3), D4 (serotipo 4)

Tabla 3.2 Número de copias virales de ARN sintético y sus diluciones para ensayos de PCR tiempo real (RT- qPCR)

Nombre	Número de copias virales	Factor dilución	Diluciones (número de copias virales)							
			1era	2da	3ra	4ta	5ta	6ta	7ma	8va
D1	3,5833E+10	1:10	3583304998	358330500	35833050	3583305	358330,50	35833,05	3583,30	358,33
D2	6,23113E+11	1:10	6,2311E+10	6231126860	623112686	62311268,6	6231126,86	623112,69	62311,27	6231,13
D3	1,87316E+11	1:10	1,8732E+10	1873163599	187316360	18731636	1873163,60	187316,36	18731,64	1873,16
D4	1,78893E+11	1:10	1,7889E+10	1788932626	178893263	17889326,3	1788932,63	178893,26	17889,33	1788,93

3.3 Curva Estándar y ensayos PCR en tiempo real (RT - qPCR)

Se obtuvo una curva estándar de Dengue 3 con el objetivo de evaluar los límites de detección y concentraciones óptimas del kit propuesto para la PCR tiempo real vs las diluciones. Una de las recomendaciones del kit empleado era emplear un tipo de experimento rápido “Fast” debido al volumen que se empleaba en el ensayo. En la Figura 3.2 se obtuvo una eficiencia del 75.416%, menor a la requerida entre 90 y 110%. Para optimizar la eficiencia se probó el tipo de experimento estándar “Standard” del propio termociclador, obteniendo una mayor eficiencia de 83.3%, como se muestra en la Figura 3.3. De esta manera, se los experimentos restantes se emplearon con este tipo de experimento.

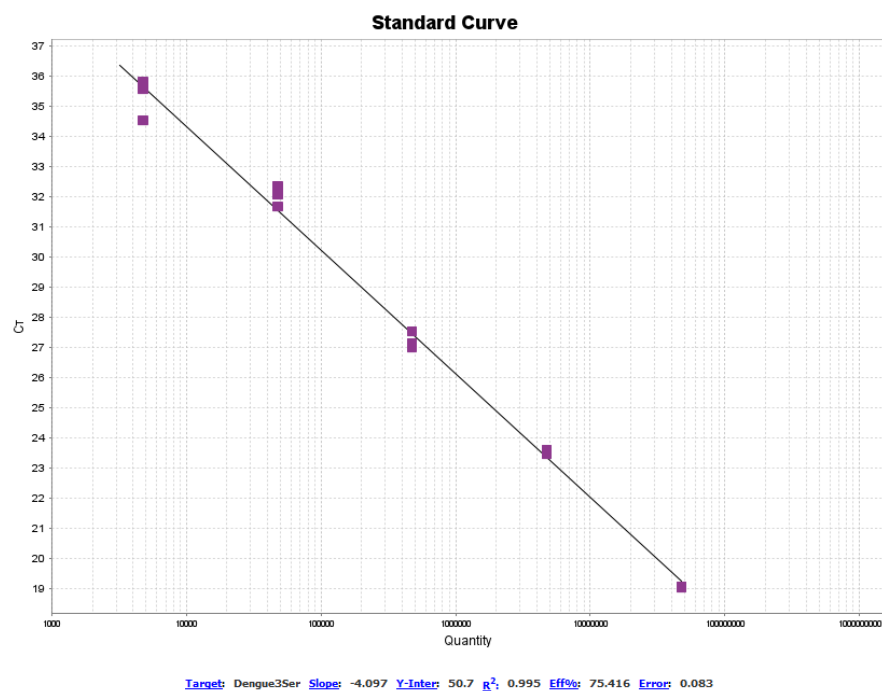


Figura 3.2 Curva estándar serotipo 3, tipo de experimento: rápido (“Fast”)

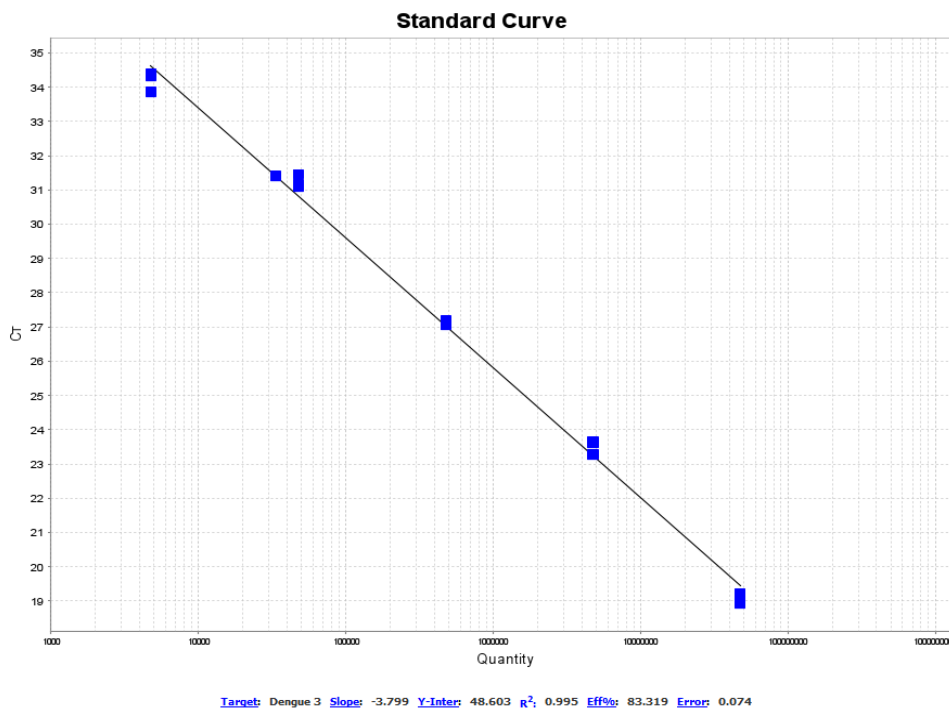


Figura 3.3 Curva estándar serotipo 3, tipo de experimento: estandar (“Standard”)

Una de las limitaciones del proyecto se dio al estudiar las interacciones de los serotipos. Se evidenció el entre cruzamiento mencionado previamente entre el serotipo 2 y serotipo 3, al existir amplificación del serotipo 2 sin que su ARN este presente. Esta amplificación indeseada puede causar desplazamientos significativos en los ciclos umbrales del multiplex, por ello para los experimentos posteriores se escogió solo uno de los dos serotipos que tenían reacción cruzada. Por conveniencia a los tres canales de fluorescencia que posee el equipo QuantStudio™ y dado que serotipo 4 emplea el mismo fluoróforo que el serotipo 3, se optó por aplicar el protocolo para el multiplex en los serotipos 1, 2 y 4 quienes no presentan esa reacción cruzada entre ellos.

3.4 Ensayos de optimización para calibración multiplex

Para la calibración del multiplex de los tres serotipos se estudiaron las interacciones de los iniciadores y sondas frente a un serotipo específico, sin embargo, ninguno evidenció inhibición significativa entre ellos. En base la experiencia de la curva estándar de Dengue 3, el rango de diluciones óptimo para calibración se encontraba entre las diluciones 2 – 8. Para el ensayo se consideró, que el número de copias

virales por cada serotipo sea similar (o al menos el mismo orden de magnitud). Se obtuvo las tres curvas correspondientes de los tres serotipos de interés, con un valor de umbral cercano, indicando que el análisis previo es adecuado para el protocolo (Figura 3.4).

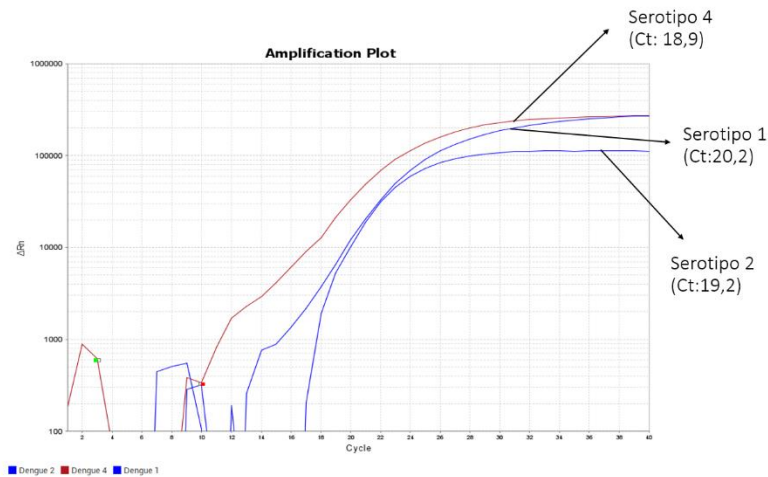


Figura 3.4 Ensayo multiplex de los serotipos 1, 2 y 4 (concentración de iniciador 0,4 uM y sonda 0,125 uM por cada serotipo)

A partir de la experiencia del multiplex previo, se plantearon treinta ensayos similares variando la concentración de la sonda de los tres serotipos, reduciendo 0.025 uM y 0.050 uM (inicialmente 0.125 uM) frente a diferentes números de copias virales, correspondiente a concentraciones altas, medias y bajas del ARN sintético (dilución 2, dilución 4 y dilución 8 respectivamente). A valores altos de números de copias el multiplex presentaba mayor variación del ciclo umbral (Ct), en contraste a menor número de copia dilución 4 y dilución 8. Este comportamiento se evidenció en diferentes concentraciones del multiplex, sin embargo, las concentraciones de sonda: serotipo 1 (0.075), serotipo 2 (0.075) y serotipo 4 (0.1) mostraron menor variación que otras pruebas, como se observa en el ciclo umbral (Ct) en la Figura 3.5 y Figura 3.6.

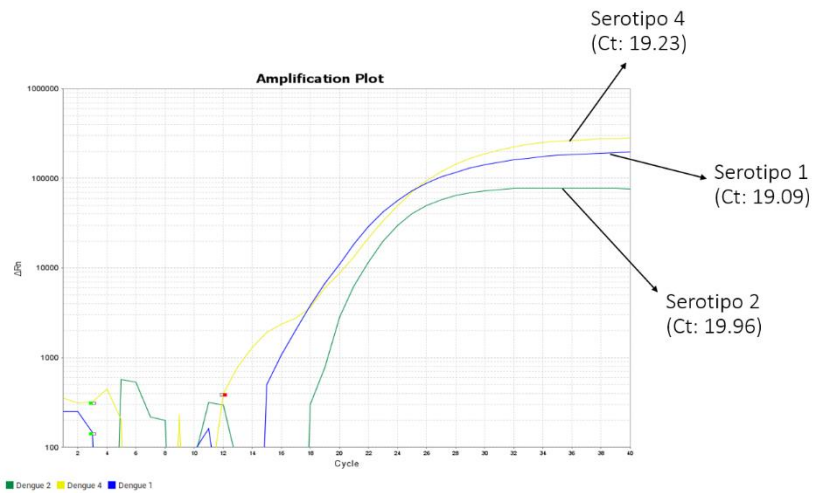


Figura 3.5 Ensayo multiplex de los serotipos 1, 2 y 4 con ARNs sintético similar orden magnitud (dilución 3 para serotipo 1 y dilución 4 para serotipo 2 y 4)

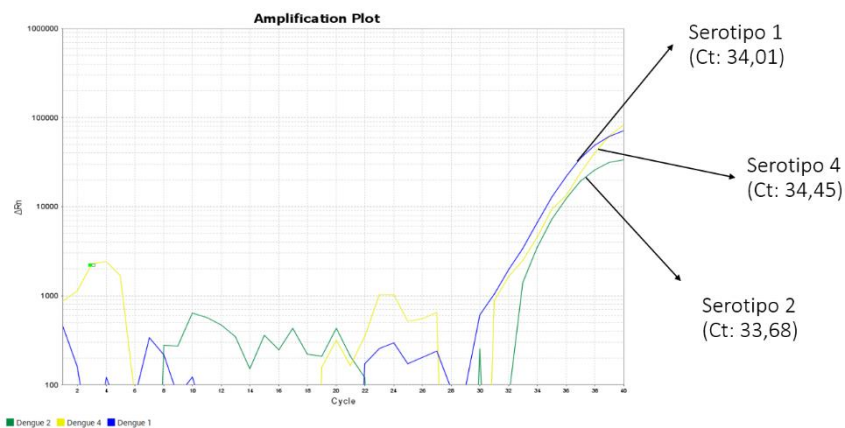


Figura 3.6 Ensayo multiplex de los serotipos 1, 2 y 4 con ARNs sintético similar orden magnitud (dilución 7 para serotipo 1 y dilución 8 para serotipo 2 y 4)

Finalmente, se obtuvo baja variación en el ciclo umbral bajo mismas condiciones, al comparar entre un ensayo multiplex y un ensayo individual, como se observa en la Figura 3.7. Este resultado nos indica que efectivamente se detecta el serotipo, sin reacciones cruzadas y/o detección inespecífica a pesar de que haya presencia de ARN de otros serotipos, iniciadores y/o sondas.

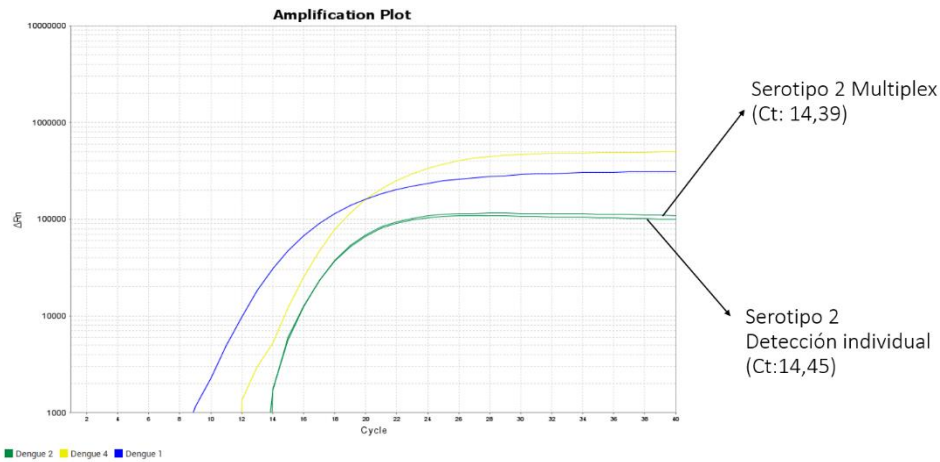


Figura 3.7 Comparación de una prueba de detección multiplex vs prueba de detección individual, bajo mismas condiciones

3.5 Análisis económico del multiplex

Uno de los beneficios principales del multiplex es el enfoque económico. Los principales materiales que se emplean para en la prueba de PCR tiempo real (RT-qPCR) se listan en la Tabla 3.3. Para el análisis se empleó el beneficio del multiplex 3 serotipos (serotipo 1, 2 y 4). La detección individual de serotipos corresponde a 3 reacciones del kit para una muestra (\$5,25) mientras el multiplex solo demanda 1 reacción del Kit por muestra (\$1,75). Por otra parte, la capacidad de análisis de muestra también se ve beneficiada con el multiplex. Para un análisis de diagnóstico individual en placas de 96, solo se puede evaluar 32 muestras con un costo de \$181,19 (Kit = \$168,96, Placa 96 = 10,9, Película 96 = 2,29). Con el multiplex, para las 32 muestras no es necesario emplear la placa de 96 pocillos, debido a que es una reacción por muestra. Para 32 muestras, se pueden emplear 4 tiras de 8 pocillos, dando un coste de \$64,2 (Kit = \$56, Tira 8 = \$5,72, Tapa de 8 = \$2,48). Como resultado para diagnóstico de tres serotipos, empleando el multiplex se tiene un ahorro del 64,57 % (\$116,99) para 32 muestras. Para el caso del multiplex de 4 serotipos, donde la capacidad de diagnóstico en placa de 96 pocillos corresponde a 24 muestras, se obtiene diagnóstico individual \$181,19 vs diagnóstico multiplex 4 serotipos \$48,15 (24 muestras), con mayor ahorro del 73,43% (\$133,04). Cabe destacar, que se puede emplear una placa de 96 pocillos para el multiplex, lo que

daría una capacidad de diagnóstico 3 veces más (3 serotipos) o 4 veces (4 serotipos) que un diagnóstico individual.

Tabla 3.3 Materiales empleados en prueba RT- qPCR

Objeto	Precio total (\$)	Número de Unidades	Precio por prueba (\$)
Kit TaqPath 1 step	3.505,68	2000 reacciones	1,75
Película adhesiva para placa 96	229	100 objetos	2,29
Placa 96 pocillos	109	10 objetos	10,9
Tira de 8 pocillos	179	125 objetos	1,43
Tiras de tapa para 8 pocillos	187	300 objetos	0,62

CAPÍTULO 4

4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1 Conclusiones

1. Uno de los procesos clave para el desarrollo de un multiplex es la evaluación completa de la especificidad e interacciones de iniciadores y sondas, debido a que ahorra tiempo, dinero y retrasos en la optimización y calibración de la prueba.
2. Las curvas estándar nos permiten analizar los rangos óptimos para optimización y calibración del multiplex, además de brindar información si las diluciones fueron correctamente realizadas, la cual fue una de las dificultades en el presente proyecto.
3. El análisis económico junto a las pruebas de optimización diagnóstico individual frente a multiplex, ofrece evidencia que el protocolo de este proyecto ofrece los lineamientos y normas para el desarrollo de pruebas multiplex costo - efectivas para diagnóstico viral.

4.2 Recomendaciones

1. Los lineamientos y normas del presente proyecto dan guía y validación para el desarrollo de futuras multiplex virales, así como indica las limitaciones que pueden ocurrir.
2. Se recomienda emplear varias metodologías de diluciones y validarlas, ya que son la base de todas las pruebas de calibración y curvas estándar.
3. Si los iniciadores o sondas provienen de una publicación científica, es importante verificar si los autores realizaron pruebas como: límites de detección, curvas estándar, interacciones con otros genomas, a fin de tener la mejor calidad posible para el multiplex y ahorrar problemas futuros.

BIBLIOGRAFÍA

- Alves, M., Guimarães, R., Cavalcanti, L., Eleutério, P., Tavares, A., & Crovela, S. (2009). Principles and applications of polymerase chain reaction in medical diagnostic fields: a review. *Brazilian Journal of Microbiology*, 40(1), 1-11.
- Balasubramanian, S., Chandy, S., Peter, R., Nachiyar, G., Sudhakar, A., Sumanth, A., & Manoharan, A. (2020). Utility of a Multiplex Real-Time Polymerase Chain Reaction for Combined Detection and Serotyping of Dengue Virus in Paediatric Patients Hospitalised with Severe Dengue: A Report from Chennai. *Indian Journal of Medical Microbiology*, 38(3-4), 288-292.
- Barkham, T., Chung, Y., Tang, K., & Ooi, E. (2006). The performance of RT-PCR compared with a rapid serological assay for acute dengue fever in a diagnostic laboratory. *Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 100(2), 142–148.
- Butler, J. (2012). Chapter 3 - DNA Quantitation. En J. Butler, *Advanced Topics in Forensic DNA Typing: Methodology* (págs. 49-67). Academic Press. Recuperado el 28 de Octubre de 2021, de <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374513-2.00003-8>
- Centers for Disease Control and Prevention. (23 de Septiembre de 2021). *About Dengue: What You Need to Know*. Recuperado el 8 de Noviembre de 2021, de <https://www.cdc.gov/dengue/about/index.html>
- De Paula, S., & Lopes, B. (2004). Dengue: a review of the laboratory tests a clinician must know to achieve a correct diagnosis. *Brazilian Society of Infectious Diseases*, 8(6).
- Díaz, V. (18 de Enero de 2016). *Una prueba detecta dengue, chikungunya y zika, en una sola muestra*. Recuperado el 20 de Noviembre de 2021, de El Comercio: <https://www.elcomercio.com/tendencias/salud/prueba-dengue-chikungunya-zika-hospitalluisvernaza.html>
- Drummond, A., Ashton, B., Buxton, S., Cheung, M., Cooper, A., Heled, J., . . . Wilson, A. (2010). Geneious v.8.1.9. Obtenido de <https://www.geneious.com/>
- Elnifro, E., Ashshi, A., Cooper, R., & Klapper, P. (2000). Multiplex PCR: Optimization and Application in Diagnostic Virology. *Clinical Microbiology Reviews*, 13(4), 559–570.
- Ferreira-de-Lima, V., & Lima-Camara, T. (2018). Natural vertical transmission of dengue virus in *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*: a systematic review. *Parasites & Vectors*, 11(77).

- González, R., Gamboa, F., Parafán, O., Suárez, M., & Montoya, J. (2007). Experiencia de un análisis entomológico de criaderos de *Aedes aegypti* y *Culex quinquefasciatus* en Cali, Colombia. *Revista Colombiana de Entomología*, 33(2), 148-156.
- Guzman, M., Halstead, S., Artsob, H., Buchy, P., Farrar, J., Gubler, D., . . . Peeling, R. (2010). Dengue: a continuing global threat. *Nature Reviews Microbiology*, 8, S7–S16.
- Halsey, E., Marks, M., Gotuzzo, E., Fiestas, V., Suarez, L., Vargas, J., . . . Laguna-Torres, V. (2012). Correlation of Serotype-Specific Dengue Virus Infection with Clinical Manifestations. *PLoS neglected tropical diseases*, 6(5), e1638.
- Hatcher, E., Zhdanov, S., Bao, Y., Blinkova, O., Nawrocki, E., Ostapchuck, Y., . . . Brister, J. (2017). Virus Variation Resource - improved response to emergent viral outbreaks. *Nucleic Acids Research*, 45(1), D482–D490.
- Holmes, E. (2007). The Evolution and Epidemiology of Dengue Virus. *XII congreso de investigación en salud pública*, (págs. 296-300). Cuernavaca, Mexico. Recuperado el 15 de Octubre de 2021, de <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=10649120>
- Kabir, M., Zilouchian , H., Younas, M., & Asghar , W. (2021). Dengue Detection: Advances in Diagnostic Tools from Conventional Technology to Point of Care. *Biosensors*, 11(7), 206.
- Khan, E., Prakoso, D., Imtiaz, K., Malik, F., Farooqi, J., Long, M., & Barr, K. (2020). The Clinical Features of Co-circulating Dengue Viruses and the Absence of Dengue Hemorrhagic Fever in Pakistan. *Frontiers in Public Health*, 8, 287.
- Kim, J., & Hwang, E. (2020). Multiplexed Diagnosis of Four Serotypes of Dengue Virus by Real-time RT-PCR. *BioChip Journal*, 421–428.
- Kolimenakis, A., Heinz, S., Wilson, M., Winkler, V., Yakob, L., Michaelakis, A., . . . Horstick, O. (2021). The role of urbanisation in the spread of *Aedes* mosquitoes and the diseases they transmit—A systematic review. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 15(9), e0009631.
- Kuno, G., Chang, G., Tsuchiya, K., Karabatsos, N., & Cropp, C. (1998). Phylogeny of the genus *Flavivirus*. *Journal of virology*, 72(1), 73-83.
- Leparc-Goffart, I., Baragatti, M., Temmam, S., Tuiskunen, A., Moureau, G., Charrel, R., & de Lamballerie, X. (2009). Development and validation of real-time one-step reverse transcription-PCR. *Journal of Clinical Virology*, 45, 61–66.

- Mackay, I., Arden, K., & Nitsche, A. (2002). Real-time PCR in virology. *Nucleic Acids Research*, 30(6), 1292–1305.
- Maljkovic Berry, I., Rutvisuttinunt, W., Sippy, R., Beltran-Ayala, A., Figueroa, K., Ryan, S., . . . Jarman, R. (2020). The origins of dengue and chikungunya viruses in Ecuador following increased migration from Venezuela and Colombia. *BMC Ecology and Evolution*, 20(31).
- Mardekian, S., & Roberts, A. (2015). Diagnostic Options and Challenges for Dengue and Chikungunya Viruses. *BioMed Research International*.
- Marmioli, N., & Maestri, E. (2007). Chapter 6 - Polymerase chain reaction (PCR). En Y. Picó, *Food Toxicants Analysis* (págs. 147-187). Elsevier. Recuperado el 28 de Octubre de 2021, de <https://doi.org/10.1016/B978-044452843-8/50007-9>
- Márquez, S., Carrera, J., Espín, E., Cifuentes, S., Trueba, G., Coloma, J., & Eisenberg, J. (2018). Dengue Serotype Differences in Urban and Semi-rural Communities in Ecuador. *Avances en ciencias e ingenierias*, 10(1), 18-23.
- Ministerio de Desarrollo Urbano y Vivienda. (2015). *Informe Nacional del Ecuador para la Tercera Conferencia de las Naciones Unidas sobre Vivienda y Desarrollo Urbano Sostenible HABITAT III*. Informe Nacional del Ecuador, Quito. Recuperado el 9 de Noviembre de 2021, de https://www.habitatyvivienda.gob.ec/wp-content/uploads/downloads/2017/05/Informe-Pais-Ecuador-Enero-2016_vf.pdf
- Ministerio de Salud Publica. (2012). *Boletín epidemiológico de Dengue No. 39, 29 de octubre de 2012*. Recuperado el 15 de Octubre de 2021, de <https://www.salud.gob.ec/boletin-epidemiologico-de-dengue-no-39-29-de-octubre-de-2012/>
- Ministerio de Salud Publica. (20 de Octubre de 2021). *Subsistema de vigilancia Sive-Alerta enfermedades transmitidas por vectores Ecuador 2021-SE 41*. Gaceta Vectorial del Ecuador. Recuperado el 8 de Noviembre de 2021, de <https://www.salud.gob.ec/wp-content/uploads/2021/11/GACETA-GENERAL-VECTORIALES-SE-41.pdf>
- Mukhopadhyay, S., Kuhn, R., & Rossmann, M. (2005). A structural perspective of the flavivirus life cycle. *Reviews*, 3, 13-22.
- QIAGEN N.V. (2014). *QuantiFast® SYBR® Green PCR Handbook*. Recuperado el 15 de Noviembre de 2021, de <https://www.qiagen.com/cn/resources/download.aspx?id=43137f31-afd9-4916-b53c-c18b0fe505b8&lang=en>

- Rey, J., & Lounibos, P. (2015). Ecología de *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus* en América y transmisión de enfermedades. *Biomédica Revista del Instituto Nacional de Salud*, 35(2).
- Rodríguez-Lázaro, D., & Hernández, M. (2014). Identification Methods | Real-Time PCR. En C. Batt, & M. Tortorello, *Encyclopedia of Food Microbiology* (págs. 344-350). Academic Press.
- Saiki, R., Gelfand, D., Stoffel, S., Scharf, S., Higuchi, R., Horn, G., . . . Erlich, H. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 239(4839), 487-491.
- Sippy, R., Herrera, D., Gaus, D., Gangnon, R., Patz, J., & Osorio, J. (2019). Seasonal patterns of dengue fever in rural Ecuador: 2009-2016. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 13(5), e0007360.
- World Health Organization. (1997). *Dengue haemorrhagic fever : diagnosis, treatment, prevention and control, 2nd ed.* Recuperado el 18 de Octubre de 2021, de <https://apps.who.int/iris/handle/10665/41988>
- World Health Organization. (2009). *Dengue: Guidelines for Diagnosis, Treatment, Prevention and Control.* Geneva, Switzerland. Recuperado el 25 de Octubre de 2021, de <https://www.who.int/tdr/publications/documents/dengue-diagnosis.pdf>
- World Health Organization. (2012). *Handbook for clinical management of dengue.* Switzerland. Recuperado el 25 de Octubre de 2021, de <https://www.who.int/publications/i/item/9789241504713>
- World Health Organization. (2019). *Fiebre amarilla.* Recuperado el 15 de Octubre de 2021, de <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/yellow-fever>
- Yung, C.-F., Lee, K.-S., Thein, T.-L., Tan, L.-K., Gan, V., Wong, J., . . . Leo, Y.-S. (2015). Dengue Serotype-Specific Differences in Clinical Manifestation, Laboratory Parameters and Risk of Severe Disease in Adults, Singapore. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 92(5), 999–1005.

APÉNDICES

APÉNDICE A

BASE DE DATOS DEL NCBI VIRUS PARA ANÁLISIS DE INICIADORES Y SONDAS

Serotipo dengue	Continente	Código accesoión	Fecha de publicación	Longitud secuencia
Dengue 1	África	MT076932	13/7/2020 19:00	10735
Dengue 1	África	MT076933	13/7/2020 19:00	10735
Dengue 1	África	MT076934	13/7/2020 19:00	10735
Dengue 1	África	MT076935	13/7/2020 19:00	10735
Dengue 1	África	MG877557	3/9/2018 19:00	10751
Dengue 1	África	KU509258	24/1/2017 19:00	10377
Dengue 1	Asia	OK562728	24/10/2021 19:00	10739
Dengue 1	Asia	MW828678	3/4/2021 19:00	10735
Dengue 1	Asia	MW582813	13/2/2021 19:00	10735
Dengue 1	Asia	MW582814	13/2/2021 19:00	10735
Dengue 1	Asia	MW582815	13/2/2021 19:00	10735
Dengue 1	Asia	MW582816	13/2/2021 19:00	10735
Dengue 1	Asia	MW396465	26/12/2020 19:00	10707
Dengue 1	Asia	MW396468	26/12/2020 19:00	10707
Dengue 1	Asia	MW386865	25/12/2020 19:00	10742
Dengue 1	Asia	MW386867	25/12/2020 19:00	10739
Dengue 1	Asia	MN886865	25/8/2020 19:00	10721
Dengue 1	Asia	MN886870	25/8/2020 19:00	10722
Dengue 1	Asia	MN886874	25/8/2020 19:00	10722
Dengue 1	Asia	LC436667	2/6/2020 19:00	10673
Dengue 1	Asia	LC436668	2/6/2020 19:00	10673
Dengue 1	Asia	MT447147	12/5/2020 19:00	10737
Dengue 1	Asia	MN018285	20/1/2020 19:00	10735
Dengue 1	Asia	MN018286	20/1/2020 19:00	10735
Dengue 1	Asia	MN018287	20/1/2020 19:00	10735
Dengue 1	Asia	MN018288	20/1/2020 19:00	10735
Dengue 1	Asia	MN018289	20/1/2020 19:00	10735
Dengue 1	Asia	MN018290	20/1/2020 19:00	10735
Dengue 1	Asia	MN018291	20/1/2020 19:00	10735
Dengue 1	Asia	MN018292	20/1/2020 19:00	10735
Dengue 1	Asia	MN018293	20/1/2020 19:00	10735
Dengue 1	Asia	MN018294	20/1/2020 19:00	10735
Dengue 1	Asia	MN018295	20/1/2020 19:00	10735
Dengue 1	Asia	MN018296	20/1/2020 19:00	10735
Dengue 1	Asia	MN018297	20/1/2020 19:00	10735
Dengue 1	Asia	MN018298	20/1/2020 19:00	10735
Dengue 1	Asia	MN018299	20/1/2020 19:00	10735
Dengue 1	Asia	MN018300	20/1/2020 19:00	10735

Dengue 1	Asia	MN018301	20/1/2020 19:00	10735
Dengue 1	Asia	MN018302	20/1/2020 19:00	10735
Dengue 1	Asia	MN018303	20/1/2020 19:00	10735
Dengue 1	Asia	MN018304	20/1/2020 19:00	10735
Dengue 1	Asia	MN018305	20/1/2020 19:00	10735
Dengue 1	Asia	MN018306	20/1/2020 19:00	10735
Dengue 1	Asia	MN018307	20/1/2020 19:00	10735
Dengue 1	Asia	MN018308	20/1/2020 19:00	10735
Dengue 1	Asia	MN018309	20/1/2020 19:00	10735
Dengue 1	Asia	MN018310	20/1/2020 19:00	10735
Dengue 1	Asia	MN018311	20/1/2020 19:00	10735
Dengue 1	Asia	MN018312	20/1/2020 19:00	10735
Dengue 1	Asia	MN018313	20/1/2020 19:00	10735
Dengue 1	Asia	MN018314	20/1/2020 19:00	10735
Dengue 1	Asia	MN018315	20/1/2020 19:00	10735
Dengue 1	Asia	MN018316	20/1/2020 19:00	10735
Dengue 1	Asia	MN018317	20/1/2020 19:00	10735
Dengue 1	Asia	MN018318	20/1/2020 19:00	10735
Dengue 1	Asia	MN018319	20/1/2020 19:00	10735
Dengue 1	Asia	MN018320	20/1/2020 19:00	10735
Dengue 1	Asia	MN018321	20/1/2020 19:00	10735
Dengue 1	Asia	MN018322	20/1/2020 19:00	10735
Dengue 1	Asia	MN018323	20/1/2020 19:00	10735
Dengue 1	Asia	MN018324	20/1/2020 19:00	10735
Dengue 1	Asia	MN018325	20/1/2020 19:00	10735
Dengue 1	Asia	MN018326	20/1/2020 19:00	10735
Dengue 1	Asia	MN018327	20/1/2020 19:00	10735
Dengue 1	Asia	MN018328	20/1/2020 19:00	10735
Dengue 1	Asia	MN018329	20/1/2020 19:00	10735
Dengue 1	Asia	MN018330	20/1/2020 19:00	10735
Dengue 1	Asia	MN018331	20/1/2020 19:00	10735
Dengue 1	Asia	MN018332	20/1/2020 19:00	10735
Dengue 1	Asia	MN018333	20/1/2020 19:00	10735
Dengue 1	Asia	MN018334	20/1/2020 19:00	10735
Dengue 1	Asia	MN018335	20/1/2020 19:00	10735
Dengue 1	Asia	MN018336	20/1/2020 19:00	10735
Dengue 1	Asia	MH891767	9/11/2019 19:00	10764
Dengue 1	Asia	MH891771	9/11/2019 19:00	10623
Dengue 1	Asia	MG097875	29/4/2019 19:00	10705
Dengue 1	Asia	MG097876	29/4/2019 19:00	10735
Dengue 1	Asia	KY672931	19/2/2019 19:00	10738
Dengue 1	Asia	KY672932	19/2/2019 19:00	10704
Dengue 1	Asia	KY672933	19/2/2019 19:00	10714
Dengue 1	Asia	KY672934	19/2/2019 19:00	10738
Dengue 1	Asia	KY672935	19/2/2019 19:00	10738
Dengue 1	Asia	KY672936	19/2/2019 19:00	10738

Dengue 1	Asia	KY672937	19/2/2019 19:00	10738
Dengue 1	Asia	KY672938	19/2/2019 19:00	10738
Dengue 1	Asia	KY672939	19/2/2019 19:00	10707
Dengue 1	Asia	KY672940	19/2/2019 19:00	10707
Dengue 1	Asia	KY672941	19/2/2019 19:00	10714
Dengue 1	Asia	KY672942	19/2/2019 19:00	10737
Dengue 1	Asia	KY672943	19/2/2019 19:00	10737
Dengue 1	Asia	KY672944	19/2/2019 19:00	10709
Dengue 1	Asia	MH823207	17/2/2019 19:00	10728
Dengue 1	Asia	MG721060	31/12/2018 19:00	10709
Dengue 1	Asia	MG721063	31/12/2018 19:00	10701
Dengue 1	Asia	MH822958	30/12/2018 19:00	10564
Dengue 1	Asia	MH822959	30/12/2018 19:00	10669
Dengue 1	Asia	KY057365	30/10/2018 19:00	10735
Dengue 1	Asia	KY057366	30/10/2018 19:00	10735
Dengue 1	Asia	KY057367	30/10/2018 19:00	10735
Dengue 1	Asia	KY057368	30/10/2018 19:00	10735
Dengue 1	Asia	KY057369	30/10/2018 19:00	10735
Dengue 1	Asia	KY057370	30/10/2018 19:00	10735
Dengue 1	Asia	KY057371	30/10/2018 19:00	10735
Dengue 1	Asia	KY057372	30/10/2018 19:00	10735
Dengue 1	Asia	KY057373	30/10/2018 19:00	10735
Dengue 1	Asia	MG767211	29/10/2018 19:00	10700
Dengue 1	Asia	MG877554	3/9/2018 19:00	10719
Dengue 1	Asia	MG877556	3/9/2018 19:00	10718
Dengue 1	Asia	MF033196	16/8/2018 19:00	10735
Dengue 1	Asia	MF033197	16/8/2018 19:00	10735
Dengue 1	Asia	MF033198	16/8/2018 19:00	10714
Dengue 1	Asia	MF033199	16/8/2018 19:00	10735
Dengue 1	Asia	MF033200	16/8/2018 19:00	10714
Dengue 1	Asia	MF033201	16/8/2018 19:00	10735
Dengue 1	Asia	MF033202	16/8/2018 19:00	10735
Dengue 1	Asia	MF033203	16/8/2018 19:00	10735
Dengue 1	Asia	MF033204	16/8/2018 19:00	10714
Dengue 1	Asia	MF033205	16/8/2018 19:00	10714
Dengue 1	Asia	MF033206	16/8/2018 19:00	10735
Dengue 1	Asia	MF033207	16/8/2018 19:00	10735
Dengue 1	Asia	MF033208	16/8/2018 19:00	10735
Dengue 1	Asia	MF033209	16/8/2018 19:00	10735
Dengue 1	Asia	MF033210	16/8/2018 19:00	10735
Dengue 1	Asia	MF033211	16/8/2018 19:00	10714
Dengue 1	Asia	MF033212	16/8/2018 19:00	10714
Dengue 1	Asia	MF033213	16/8/2018 19:00	10714
Dengue 1	Asia	MF033214	16/8/2018 19:00	10735
Dengue 1	Asia	MF033215	16/8/2018 19:00	10735
Dengue 1	Asia	MF033216	16/8/2018 19:00	10735

Dengue 1	Asia	MF033217	16/8/2018 19:00	10710
Dengue 1	Asia	MF033218	16/8/2018 19:00	10735
Dengue 1	Asia	MF033219	16/8/2018 19:00	10735
Dengue 1	Asia	MF033220	16/8/2018 19:00	10735
Dengue 1	Asia	MF033221	16/8/2018 19:00	10685
Dengue 1	Asia	MF033222	16/8/2018 19:00	10735
Dengue 1	Asia	MF033223	16/8/2018 19:00	10735
Dengue 1	Asia	MF033224	16/8/2018 19:00	10661
Dengue 1	Asia	MF033225	16/8/2018 19:00	10735
Dengue 1	Asia	MF033226	16/8/2018 19:00	10714
Dengue 1	Asia	MF033227	16/8/2018 19:00	10714
Dengue 1	Asia	MF033228	16/8/2018 19:00	10735
Dengue 1	Asia	MF033229	16/8/2018 19:00	10714
Dengue 1	Asia	MF033230	16/8/2018 19:00	10735
Dengue 1	Asia	MF033231	16/8/2018 19:00	10735
Dengue 1	Asia	MF033232	16/8/2018 19:00	10735
Dengue 1	Asia	MF033233	16/8/2018 19:00	10735
Dengue 1	Asia	MF033234	16/8/2018 19:00	10714
Dengue 1	Asia	MF033235	16/8/2018 19:00	10735
Dengue 1	Asia	MF033236	16/8/2018 19:00	10735
Dengue 1	Asia	MF033237	16/8/2018 19:00	10714
Dengue 1	Asia	MF033238	16/8/2018 19:00	10714
Dengue 1	Asia	MF033239	16/8/2018 19:00	10735
Dengue 1	Asia	MF033240	16/8/2018 19:00	10735
Dengue 1	Asia	MF033241	16/8/2018 19:00	10686
Dengue 1	Asia	MF033242	16/8/2018 19:00	10714
Dengue 1	Asia	MF033243	16/8/2018 19:00	10714
Dengue 1	Asia	MF033244	16/8/2018 19:00	10735
Dengue 1	Asia	MF033245	16/8/2018 19:00	10735
Dengue 1	Asia	MF033246	16/8/2018 19:00	10735
Dengue 1	Asia	MF033247	16/8/2018 19:00	10735
Dengue 1	Asia	MF033248	16/8/2018 19:00	10735
Dengue 1	Asia	MF033249	16/8/2018 19:00	10680
Dengue 1	Asia	MF033250	16/8/2018 19:00	10681
Dengue 1	Asia	MF033251	16/8/2018 19:00	10714
Dengue 1	Asia	MF033252	16/8/2018 19:00	10714
Dengue 1	Asia	MF033253	16/8/2018 19:00	10714
Dengue 1	Asia	MF033254	16/8/2018 19:00	10690
Dengue 1	Asia	MF033255	16/8/2018 19:00	10714
Dengue 1	Asia	MF033256	16/8/2018 19:00	10714
Dengue 1	Asia	MF033257	16/8/2018 19:00	10735
Dengue 1	Asia	MF033258	16/8/2018 19:00	10676
Dengue 1	Asia	MF033259	16/8/2018 19:00	10677
Dengue 1	Asia	MF033260	16/8/2018 19:00	10735
Dengue 1	Asia	MF033261	16/8/2018 19:00	10714
Dengue 1	Asia	MG560265	6/8/2018 19:00	10604

Dengue 1	Asia	MG560266	6/8/2018 19:00	10583
Dengue 1	Asia	MG560267	6/8/2018 19:00	10583
Dengue 1	Asia	MG560268	6/8/2018 19:00	10583
Dengue 1	Asia	MG560269	6/8/2018 19:00	10583
Dengue 1	Asia	MG679800	2/8/2018 19:00	10735
Dengue 1	Asia	MG679801	2/8/2018 19:00	10735
Dengue 1	Asia	KX618705	26/6/2018 19:00	10735
Dengue 1	Asia	KX618706	26/6/2018 19:00	10735
Dengue 1	Asia	MF314188	13/5/2018 19:00	10706
Dengue 1	Asia	MF681692	3/2/2018 19:00	10735
Dengue 1	Asia	MF681693	3/2/2018 19:00	10735
Dengue 1	Asia	MF683116	3/2/2018 19:00	10735
Dengue 1	Asia	MF683117	3/2/2018 19:00	10735
Dengue 1	Asia	MF405201	30/7/2017 19:00	10821
Dengue 1	Asia	KX595191	4/6/2017 19:00	10732
Dengue 1	Asia	KY921902	5/5/2017 19:00	10735
Dengue 1	Asia	KY921903	5/5/2017 19:00	10714
Dengue 1	Asia	KX459386	21/2/2017 19:00	10666
Dengue 1	Asia	KX459387	21/2/2017 19:00	10670
Dengue 1	Asia	KX459388	21/2/2017 19:00	10666
Dengue 1	Asia	KX459389	21/2/2017 19:00	10664
Dengue 1	Asia	KX459390	21/2/2017 19:00	10668
Dengue 1	Asia	KX459391	21/2/2017 19:00	10623
Dengue 1	Asia	KX459392	21/2/2017 19:00	10673
Dengue 1	Asia	KX621249	21/2/2017 19:00	10643
Dengue 1	Asia	KX621250	21/2/2017 19:00	10649
Dengue 1	Asia	KX621251	21/2/2017 19:00	10624
Dengue 1	Asia	KX621252	21/2/2017 19:00	10618
Dengue 1	Asia	KU509250	24/1/2017 19:00	10567
Dengue 1	Asia	KU509253	24/1/2017 19:00	10624
Dengue 1	Asia	KU509255	24/1/2017 19:00	10335
Dengue 1	Asia	KU509261	24/1/2017 19:00	10583
Dengue 1	Asia	KU509263	24/1/2017 19:00	10375
Dengue 1	Asia	KU509266	24/1/2017 19:00	10665
Dengue 1	Asia	KX225483	22/1/2017 19:00	10651
Dengue 1	Asia	KX225484	22/1/2017 19:00	10692
Dengue 1	Asia	KX225487	22/1/2017 19:00	10618
Dengue 1	Asia	KX225488	22/1/2017 19:00	10692
Dengue 1	Asia	KX225489	22/1/2017 19:00	10678
Dengue 1	Asia	KX225490	22/1/2017 19:00	10676
Dengue 1	Asia	KX225491	22/1/2017 19:00	10688
Dengue 1	Asia	KX225492	22/1/2017 19:00	10691
Dengue 1	Asia	KX225493	22/1/2017 19:00	10691
Dengue 1	Asia	KX620451	21/1/2017 19:00	10670
Dengue 1	Asia	KX620452	21/1/2017 19:00	10666
Dengue 1	Asia	KX620453	21/1/2017 19:00	10667

Dengue 1	Asia	KX620454	21/1/2017 19:00	10443
Dengue 1	Asia	KX620455	21/1/2017 19:00	10687
Dengue 1	Asia	KX458014	11/7/2016 19:00	10735
Dengue 1	Asia	KJ755855	15/3/2016 19:00	10727
Dengue 1	Asia	KM403575	8/3/2016 19:00	10714
Dengue 1	Asia	KM403576	8/3/2016 19:00	10665
Dengue 1	Asia	KM403577	8/3/2016 19:00	10714
Dengue 1	Asia	KM403578	8/3/2016 19:00	10714
Dengue 1	Asia	KM403579	8/3/2016 19:00	10714
Dengue 1	Asia	KM403580	8/3/2016 19:00	10627
Dengue 1	Asia	KM403581	8/3/2016 19:00	10714
Dengue 1	Asia	KM403582	8/3/2016 19:00	10714
Dengue 1	Asia	KM403583	8/3/2016 19:00	10714
Dengue 1	Asia	KM403584	8/3/2016 19:00	10714
Dengue 1	Asia	KM403585	8/3/2016 19:00	10669
Dengue 1	Asia	KM403586	8/3/2016 19:00	10649
Dengue 1	Asia	KM403587	8/3/2016 19:00	10714
Dengue 1	Asia	KM403588	8/3/2016 19:00	10714
Dengue 1	Asia	KM403589	8/3/2016 19:00	10714
Dengue 1	Asia	KM403590	8/3/2016 19:00	10714
Dengue 1	Asia	KM403591	8/3/2016 19:00	10714
Dengue 1	Asia	KM403592	8/3/2016 19:00	10714
Dengue 1	Asia	KM403593	8/3/2016 19:00	10713
Dengue 1	Asia	KM403594	8/3/2016 19:00	10714
Dengue 1	Asia	KM403595	8/3/2016 19:00	10714
Dengue 1	Asia	KM403596	8/3/2016 19:00	10714
Dengue 1	Asia	KM403597	8/3/2016 19:00	10714
Dengue 1	Asia	KM403598	8/3/2016 19:00	10646
Dengue 1	Asia	KM403599	8/3/2016 19:00	10670
Dengue 1	Asia	KM403600	8/3/2016 19:00	10699
Dengue 1	Asia	KM403601	8/3/2016 19:00	10648
Dengue 1	Asia	KM403602	8/3/2016 19:00	10714
Dengue 1	Asia	KM403603	8/3/2016 19:00	10714
Dengue 1	Asia	KM403604	8/3/2016 19:00	10714
Dengue 1	Asia	KM403605	8/3/2016 19:00	10714
Dengue 1	Asia	KM403606	8/3/2016 19:00	10714
Dengue 1	Asia	KM403607	8/3/2016 19:00	10714
Dengue 1	Asia	KM403608	8/3/2016 19:00	10714
Dengue 1	Asia	KM403609	8/3/2016 19:00	10714
Dengue 1	Asia	KM403610	8/3/2016 19:00	10714
Dengue 1	Asia	KM403611	8/3/2016 19:00	10714
Dengue 1	Asia	KM403612	8/3/2016 19:00	10714
Dengue 1	Asia	KM403613	8/3/2016 19:00	10714
Dengue 1	Asia	KM403614	8/3/2016 19:00	10714
Dengue 1	Asia	KM403615	8/3/2016 19:00	10714
Dengue 1	Asia	KM403616	8/3/2016 19:00	10714

Dengue 1	Asia	KM403617	8/3/2016 19:00	10714
Dengue 1	Asia	KM403618	8/3/2016 19:00	10714
Dengue 1	Asia	KM403619	8/3/2016 19:00	10714
Dengue 1	Asia	KM403620	8/3/2016 19:00	10698
Dengue 1	Asia	KM403621	8/3/2016 19:00	10662
Dengue 1	Asia	KM403622	8/3/2016 19:00	10714
Dengue 1	Asia	KM403623	8/3/2016 19:00	10714
Dengue 1	Asia	KM403624	8/3/2016 19:00	10714
Dengue 1	Asia	KM403625	8/3/2016 19:00	10714
Dengue 1	Asia	KM403626	8/3/2016 19:00	10714
Dengue 1	Asia	KM403627	8/3/2016 19:00	10714
Dengue 1	Asia	KM403628	8/3/2016 19:00	10714
Dengue 1	Asia	KM403629	8/3/2016 19:00	10637
Dengue 1	Asia	KM403630	8/3/2016 19:00	10714
Dengue 1	Asia	KM403631	8/3/2016 19:00	10714
Dengue 1	Asia	KM403632	8/3/2016 19:00	10714
Dengue 1	Asia	KM403633	8/3/2016 19:00	10714
Dengue 1	Asia	KM403634	8/3/2016 19:00	10714
Dengue 1	Asia	KM403635	8/3/2016 19:00	10714
Dengue 1	Asia	KM403636	8/3/2016 19:00	10714
Dengue 1	Asia	KR024705	21/2/2016 19:00	10703
Dengue 1	Asia	KR024706	21/2/2016 19:00	10703
Dengue 1	Asia	KR024707	21/2/2016 19:00	10703
Dengue 1	Asia	KR024708	21/2/2016 19:00	10703
Dengue 1	Asia	KT187559	24/11/2015 19:00	10714
Dengue 1	Asia	KT187560	24/11/2015 19:00	10714
Dengue 1	Asia	KT187561	24/11/2015 19:00	10714
Dengue 1	Asia	KT187562	24/11/2015 19:00	10714
Dengue 1	Asia	KT187563	24/11/2015 19:00	10714
Dengue 1	Asia	KT187564	24/11/2015 19:00	10735
Dengue 1	Asia	KP723473	20/7/2015 19:00	10630
Dengue 1	Asia	KP723476	20/7/2015 19:00	10628
Dengue 1	Asia	KP686070	29/6/2015 19:00	10670
Dengue 1	Asia	KP398852	17/4/2015 19:00	10735
Dengue 1	Asia	KC762639	16/1/2015 19:00	10735
Dengue 1	Asia	KC762642	16/1/2015 19:00	10735
Dengue 1	Asia	KC762647	16/1/2015 19:00	10735
Dengue 1	Asia	KJ649286	30/12/2014 19:00	10622
Dengue 1	Asia	KJ726662	1/7/2014 19:00	10690
Dengue 1	Asia	KJ726663	1/7/2014 19:00	10659
Dengue 1	Asia	KJ726664	1/7/2014 19:00	10684
Dengue 1	Asia	KF289072	13/5/2014 19:00	10669
Dengue 1	Asia	KJ438293	25/4/2014 19:00	10724
Dengue 1	Asia	KJ438296	25/4/2014 19:00	10735
Dengue 1	Asia	KF971869	7/3/2014 19:00	10583
Dengue 1	Asia	KF971870	7/3/2014 19:00	10583

Dengue 1	Asia	KF971871	7/3/2014 19:00	10583
Dengue 1	Asia	JQ692085	3/3/2014 19:00	10669
Dengue 1	Asia	KF864667	9/2/2014 19:00	10141
Dengue 1	Asia	HG316481	14/8/2013 19:00	10735
Dengue 1	Asia	HG316482	14/8/2013 19:00	10735
Dengue 1	Asia	KC759167	28/5/2013 19:00	10735
Dengue 1	Asia	KC131140	24/2/2013 19:00	10668
Dengue 1	Asia	KC131141	24/2/2013 19:00	10671
Dengue 1	Asia	JQ048541	20/3/2012 19:00	10718
Dengue 1	Asia	JN054255	22/7/2011 19:00	10735
Dengue 1	Europe	KJ468234	16/9/2014 19:00	10622
Dengue 1	Norteamérica	MG877553	3/9/2018 19:00	10719
Dengue 1	Norteamérica	KY829115	16/5/2017 19:00	10717
Dengue 1	Norteamérica	KU509249	24/1/2017 19:00	10582
Dengue 1	Norteamérica	KU509264	24/1/2017 19:00	10246
Dengue 1	Norteamérica	KT279761	20/10/2015 19:00	10735
Dengue 1	Norteamérica	KF973453	19/12/2014 19:00	10303
Dengue 1	Norteamérica	KF973454	19/12/2014 19:00	10619
Dengue 1	Norteamérica	KF973455	19/12/2014 19:00	10606
Dengue 1	Norteamérica	KF973456	19/12/2014 19:00	10327
Dengue 1	Norteamérica	KF973457	19/12/2014 19:00	10615
Dengue 1	Norteamérica	KF973458	19/12/2014 19:00	10290
Dengue 1	Norteamérica	KF973459	19/12/2014 19:00	10238
Dengue 1	Norteamérica	KF973460	19/12/2014 19:00	10630
Dengue 1	Norteamérica	KF973461	19/12/2014 19:00	10580
Dengue 1	Norteamérica	KF973462	19/12/2014 19:00	10336
Dengue 1	Norteamérica	KF973463	19/12/2014 19:00	10608
Dengue 1	Norteamérica	KF973464	19/12/2014 19:00	10608
Dengue 1	Norteamérica	KF973465	19/12/2014 19:00	10559
Dengue 1	Norteamérica	KF973466	19/12/2014 19:00	10618
Dengue 1	Norteamérica	KF973467	19/12/2014 19:00	10198
Dengue 1	Norteamérica	KF973468	19/12/2014 19:00	10599
Dengue 1	Norteamérica	KF973469	19/12/2014 19:00	10620
Dengue 1	Norteamérica	KF973470	19/12/2014 19:00	10731
Dengue 1	Norteamérica	KF973471	19/12/2014 19:00	10625
Dengue 1	Norteamérica	KF973472	19/12/2014 19:00	10616
Dengue 1	Norteamérica	KF973473	19/12/2014 19:00	10304
Dengue 1	Norteamérica	KF973474	19/12/2014 19:00	10616
Dengue 1	Norteamérica	KF973475	19/12/2014 19:00	10615
Dengue 1	Norteamérica	KJ189306	9/2/2014 19:00	10445
Dengue 1	Norteamérica	KJ189307	9/2/2014 19:00	10445
Dengue 1	Norteamérica	KJ189348	9/2/2014 19:00	10445
Dengue 1	Norteamérica	KJ189349	9/2/2014 19:00	10384
Dengue 1	Norteamérica	KJ189350	9/2/2014 19:00	10445
Dengue 1	Norteamérica	KJ189351	9/2/2014 19:00	10448
Dengue 1	Norteamérica	KJ189352	9/2/2014 19:00	10448

Dengue 1	Norteamérica	KJ189353	9/2/2014 19:00	10444
Dengue 1	Norteamérica	KJ189354	9/2/2014 19:00	10443
Dengue 1	Norteamérica	KJ189355	9/2/2014 19:00	10444
Dengue 1	Norteamérica	KJ189356	9/2/2014 19:00	10442
Dengue 1	Norteamérica	KJ189357	9/2/2014 19:00	10444
Dengue 1	Norteamérica	KJ189358	9/2/2014 19:00	10444
Dengue 1	Norteamérica	KJ189359	9/2/2014 19:00	10444
Dengue 1	Norteamérica	KJ189360	9/2/2014 19:00	10265
Dengue 1	Norteamérica	KJ189361	9/2/2014 19:00	10522
Dengue 1	Norteamérica	KJ189362	9/2/2014 19:00	10456
Dengue 1	Norteamérica	KJ189363	9/2/2014 19:00	10648
Dengue 1	Norteamérica	KJ189364	9/2/2014 19:00	10444
Dengue 1	Norteamérica	KJ189365	9/2/2014 19:00	10798
Dengue 1	Norteamérica	KJ189366	9/2/2014 19:00	10453
Dengue 1	Norteamérica	KJ189367	9/2/2014 19:00	10452
Dengue 1	Norteamérica	KJ189368	9/2/2014 19:00	10480
Dengue 1	Norteamérica	KJ189369	9/2/2014 19:00	10456
Dengue 1	Norteamérica	JQ675358	19/5/2012 19:00	10605
Dengue 1	Oceanía	MW315172	1/8/2021 19:00	10735
Dengue 1	Oceanía	MW315175	1/8/2021 19:00	10741
Dengue 1	Oceanía	MW315176	1/8/2021 19:00	10735
Dengue 1	Oceanía	MW315177	1/8/2021 19:00	10735
Dengue 1	Oceanía	MW315178	1/8/2021 19:00	10734
Dengue 1	Oceanía	MW315181	1/8/2021 19:00	10745
Dengue 1	Oceanía	MW315182	1/8/2021 19:00	10734
Dengue 1	Oceanía	MW315183	1/8/2021 19:00	10735
Dengue 1	Oceanía	MW315185	1/8/2021 19:00	10735
Dengue 1	Oceanía	MW315188	1/8/2021 19:00	10735
Dengue 1	Oceanía	MW315189	1/8/2021 19:00	10735
Dengue 1	Oceanía	MW315191	1/8/2021 19:00	10735
Dengue 1	Oceanía	MW315194	1/8/2021 19:00	10745
Dengue 1	Oceanía	MW315195	1/8/2021 19:00	10734
Dengue 1	Oceanía	MH921566	5/11/2018 19:00	10706
Dengue 1	Oceanía	MH921567	5/11/2018 19:00	10706
Dengue 1	Oceanía	MG877555	3/9/2018 19:00	10719
Dengue 1	Oceanía	KY926848	17/3/2018 19:00	10597
Dengue 1	Sudamérica	MH450312	14/7/2018 19:00	10752
Dengue 1	Sudamérica	KY474303	13/1/2018 19:00	10678
Dengue 1	Sudamérica	KY474304	13/1/2018 19:00	10678
Dengue 1	Sudamérica	KY474305	13/1/2018 19:00	10676
Dengue 1	Sudamérica	KY474306	13/1/2018 19:00	10677
Dengue 1	Sudamérica	KY474307	13/1/2018 19:00	10677
Dengue 1	Sudamérica	MF797878	15/10/2017 19:00	10687
Dengue 1	Sudamérica	KU509252	24/1/2017 19:00	10554
Dengue 1	Sudamérica	KU509254	24/1/2017 19:00	10569
Dengue 1	Sudamérica	KP188539	14/7/2016 19:00	10416

Dengue 1	Sudamérica	KP188540	14/7/2016 19:00	10699
Dengue 1	Sudamérica	KP188541	14/7/2016 19:00	10490
Dengue 1	Sudamérica	KP188542	14/7/2016 19:00	10607
Dengue 1	Sudamérica	KP188543	14/7/2016 19:00	10917
Dengue 1	Sudamérica	KP188544	14/7/2016 19:00	10917
Dengue 1	Sudamérica	KP188545	14/7/2016 19:00	10621
Dengue 1	Sudamérica	KP188546	14/7/2016 19:00	10663
Dengue 1	Sudamérica	KP188547	14/7/2016 19:00	10776
Dengue 1	Sudamérica	KP188548	14/7/2016 19:00	10647
Dengue 1	Sudamérica	KP188567	14/7/2016 19:00	10618
Dengue 1	Sudamérica	KP188568	14/7/2016 19:00	10607
Dengue 1	Sudamérica	KC692511	11/8/2014 19:00	10735
Dengue 1	Sudamérica	KC692512	11/8/2014 19:00	10735
Dengue 1	Sudamérica	KC692513	11/8/2014 19:00	10735
Dengue 1	Sudamérica	KC692514	11/8/2014 19:00	10735
Dengue 1	Sudamérica	KC692515	11/8/2014 19:00	10735
Dengue 1	Sudamérica	KC692516	11/8/2014 19:00	10735
Dengue 1	Sudamérica	KC692517	11/8/2014 19:00	10735
Dengue 1	Sudamérica	JX669461	10/10/2013 19:00	10736
Dengue 1	Sudamérica	JX669462	10/10/2013 19:00	10737
Dengue 1	Sudamérica	JX669463	10/10/2013 19:00	10735
Dengue 1	Sudamérica	JX669464	10/10/2013 19:00	10736
Dengue 1	Sudamérica	JX669465	10/10/2013 19:00	10736
Dengue 1	Sudamérica	JX669466	10/10/2013 19:00	10737
Dengue 2	África	MT076937	13/7/2020 19:00	10723
Dengue 2	África	MN272404	2/10/2019 19:00	10724
Dengue 2	África	MN272405	2/10/2019 19:00	10724
Dengue 2	África	MG189962	31/10/2017 19:00	10665
Dengue 2	África	KY627762	2/3/2017 19:00	10675
Dengue 2	África	KY627763	2/3/2017 19:00	10675
Dengue 2	Asia	MW512362	8/7/2021 19:00	10723
Dengue 2	Asia	MW512363	8/7/2021 19:00	10723
Dengue 2	Asia	MW512364	8/7/2021 19:00	10723
Dengue 2	Asia	MW512365	8/7/2021 19:00	10723
Dengue 2	Asia	MW512366	8/7/2021 19:00	10723
Dengue 2	Asia	MW512367	8/7/2021 19:00	10723
Dengue 2	Asia	MW512368	8/7/2021 19:00	10723
Dengue 2	Asia	MW512369	8/7/2021 19:00	10723
Dengue 2	Asia	MW512370	8/7/2021 19:00	10723
Dengue 2	Asia	MW512371	8/7/2021 19:00	10723
Dengue 2	Asia	MW512372	8/7/2021 19:00	10723
Dengue 2	Asia	MW512373	8/7/2021 19:00	10723
Dengue 2	Asia	MW512374	8/7/2021 19:00	10723
Dengue 2	Asia	MW512375	8/7/2021 19:00	10723
Dengue 2	Asia	MW512376	8/7/2021 19:00	10723
Dengue 2	Asia	MW512377	8/7/2021 19:00	10723

Dengue 2	Asia	MW512430	8/7/2021 19:00	10723
Dengue 2	Asia	MW512431	8/7/2021 19:00	10723
Dengue 2	Asia	MW512432	8/7/2021 19:00	10723
Dengue 2	Asia	MW512433	8/7/2021 19:00	10723
Dengue 2	Asia	MW512434	8/7/2021 19:00	10723
Dengue 2	Asia	MW512435	8/7/2021 19:00	10723
Dengue 2	Asia	MW512436	8/7/2021 19:00	10723
Dengue 2	Asia	MW512437	8/7/2021 19:00	10723
Dengue 2	Asia	MW512438	8/7/2021 19:00	10723
Dengue 2	Asia	MW512439	8/7/2021 19:00	10723
Dengue 2	Asia	MW512440	8/7/2021 19:00	10723
Dengue 2	Asia	MW512441	8/7/2021 19:00	10723
Dengue 2	Asia	MW512443	8/7/2021 19:00	10723
Dengue 2	Asia	MW512444	8/7/2021 19:00	10723
Dengue 2	Asia	MW512445	8/7/2021 19:00	10723
Dengue 2	Asia	MW512446	8/7/2021 19:00	10723
Dengue 2	Asia	MW512447	8/7/2021 19:00	10723
Dengue 2	Asia	MW512448	8/7/2021 19:00	10723
Dengue 2	Asia	MW512449	8/7/2021 19:00	10723
Dengue 2	Asia	MW512450	8/7/2021 19:00	10723
Dengue 2	Asia	MW512451	8/7/2021 19:00	10723
Dengue 2	Asia	MW512454	8/7/2021 19:00	10723
Dengue 2	Asia	MW512456	8/7/2021 19:00	10723
Dengue 2	Asia	MW512457	8/7/2021 19:00	10723
Dengue 2	Asia	MW512458	8/7/2021 19:00	10723
Dengue 2	Asia	MW512461	8/7/2021 19:00	10723
Dengue 2	Asia	MW512462	8/7/2021 19:00	10723
Dengue 2	Asia	MW512465	8/7/2021 19:00	10723
Dengue 2	Asia	MW512467	8/7/2021 19:00	10723
Dengue 2	Asia	MW512468	8/7/2021 19:00	10723
Dengue 2	Asia	MW512469	8/7/2021 19:00	10718
Dengue 2	Asia	MW512470	8/7/2021 19:00	10718
Dengue 2	Asia	MW512471	8/7/2021 19:00	10723
Dengue 2	Asia	MW512472	8/7/2021 19:00	10723
Dengue 2	Asia	MW512473	8/7/2021 19:00	10723
Dengue 2	Asia	MW512474	8/7/2021 19:00	10723
Dengue 2	Asia	MW512475	8/7/2021 19:00	10723
Dengue 2	Asia	MW512476	8/7/2021 19:00	10723
Dengue 2	Asia	MW512477	8/7/2021 19:00	10723
Dengue 2	Asia	MW512479	8/7/2021 19:00	10723
Dengue 2	Asia	MW512480	8/7/2021 19:00	10723
Dengue 2	Asia	MW512481	8/7/2021 19:00	10723
Dengue 2	Asia	MW512482	8/7/2021 19:00	10713
Dengue 2	Asia	MW512483	8/7/2021 19:00	10723
Dengue 2	Asia	MW512485	8/7/2021 19:00	10723
Dengue 2	Asia	MW512486	8/7/2021 19:00	10721

Dengue 2	Asia	MW512487	8/7/2021 19:00	10721
Dengue 2	Asia	MW512488	8/7/2021 19:00	10721
Dengue 2	Asia	MW512489	8/7/2021 19:00	10723
Dengue 2	Asia	MW512490	8/7/2021 19:00	10723
Dengue 2	Asia	MW512491	8/7/2021 19:00	10723
Dengue 2	Asia	MW512492	8/7/2021 19:00	10723
Dengue 2	Asia	MW512493	8/7/2021 19:00	10723
Dengue 2	Asia	MW512494	8/7/2021 19:00	10723
Dengue 2	Asia	MW512496	8/7/2021 19:00	10721
Dengue 2	Asia	MW512497	8/7/2021 19:00	10721
Dengue 2	Asia	MW512498	8/7/2021 19:00	10721
Dengue 2	Asia	MW186239	22/3/2021 19:00	10723
Dengue 2	Asia	MW186240	22/3/2021 19:00	10723
Dengue 2	Asia	MK783189	10/1/2021 19:00	10677
Dengue 2	Asia	MK783190	10/1/2021 19:00	10674
Dengue 2	Asia	MK783191	10/1/2021 19:00	10678
Dengue 2	Asia	MK783192	10/1/2021 19:00	10683
Dengue 2	Asia	MK783193	10/1/2021 19:00	10678
Dengue 2	Asia	MK783194	10/1/2021 19:00	10679
Dengue 2	Asia	MK783195	10/1/2021 19:00	10678
Dengue 2	Asia	MK783196	10/1/2021 19:00	10679
Dengue 2	Asia	MK783197	10/1/2021 19:00	10683
Dengue 2	Asia	MK783198	10/1/2021 19:00	10638
Dengue 2	Asia	MK783199	10/1/2021 19:00	10678
Dengue 2	Asia	MK783200	10/1/2021 19:00	10683
Dengue 2	Asia	MK783201	10/1/2021 19:00	10683
Dengue 2	Asia	MK783202	10/1/2021 19:00	10637
Dengue 2	Asia	MK783203	10/1/2021 19:00	10683
Dengue 2	Asia	MK783204	10/1/2021 19:00	10678
Dengue 2	Asia	MK783205	10/1/2021 19:00	10683
Dengue 2	Asia	MK783206	10/1/2021 19:00	10694
Dengue 2	Asia	MK783207	10/1/2021 19:00	10680
Dengue 2	Asia	MK783208	10/1/2021 19:00	10726
Dengue 2	Asia	MK783209	10/1/2021 19:00	10658
Dengue 2	Asia	MK783210	10/1/2021 19:00	10686
Dengue 2	Asia	MN294937	31/8/2020 19:00	10723
Dengue 2	Asia	MT180479	25/6/2020 19:00	10723
Dengue 2	Asia	LC436669	2/6/2020 19:00	10671
Dengue 2	Asia	LC436670	2/6/2020 19:00	10671
Dengue 2	Asia	LC436671	2/6/2020 19:00	10671
Dengue 2	Asia	LC436672	2/6/2020 19:00	10671
Dengue 2	Asia	LC436673	2/6/2020 19:00	10671
Dengue 2	Asia	LC436674	2/6/2020 19:00	10671
Dengue 2	Asia	LC436675	2/6/2020 19:00	10671
Dengue 2	Asia	MN018337	20/1/2020 19:00	10724
Dengue 2	Asia	MN018338	20/1/2020 19:00	10724

Dengue 2	Asia	MN018339	20/1/2020 19:00	10724
Dengue 2	Asia	MN018340	20/1/2020 19:00	10724
Dengue 2	Asia	MN018341	20/1/2020 19:00	10724
Dengue 2	Asia	MN018342	20/1/2020 19:00	10724
Dengue 2	Asia	MN018343	20/1/2020 19:00	10724
Dengue 2	Asia	MN018344	20/1/2020 19:00	10724
Dengue 2	Asia	MN018345	20/1/2020 19:00	10724
Dengue 2	Asia	MN018346	20/1/2020 19:00	10724
Dengue 2	Asia	MN018347	20/1/2020 19:00	10724
Dengue 2	Asia	MN018348	20/1/2020 19:00	10724
Dengue 2	Asia	MN018349	20/1/2020 19:00	10724
Dengue 2	Asia	MN018350	20/1/2020 19:00	10724
Dengue 2	Asia	MN018351	20/1/2020 19:00	10724
Dengue 2	Asia	MN018352	20/1/2020 19:00	10724
Dengue 2	Asia	MN018353	20/1/2020 19:00	10724
Dengue 2	Asia	MN018354	20/1/2020 19:00	10724
Dengue 2	Asia	MN018355	20/1/2020 19:00	10724
Dengue 2	Asia	MN018356	20/1/2020 19:00	10724
Dengue 2	Asia	MN018357	20/1/2020 19:00	10724
Dengue 2	Asia	MN018358	20/1/2020 19:00	10724
Dengue 2	Asia	MN018359	20/1/2020 19:00	10724
Dengue 2	Asia	MN018360	20/1/2020 19:00	10724
Dengue 2	Asia	MN018361	20/1/2020 19:00	10724
Dengue 2	Asia	MN018362	20/1/2020 19:00	10724
Dengue 2	Asia	MN018363	20/1/2020 19:00	10724
Dengue 2	Asia	MN018364	20/1/2020 19:00	10724
Dengue 2	Asia	MN018365	20/1/2020 19:00	10724
Dengue 2	Asia	MN018366	20/1/2020 19:00	10724
Dengue 2	Asia	MH891768	9/11/2019 19:00	10716
Dengue 2	Asia	MH891770	9/11/2019 19:00	10446
Dengue 2	Asia	MH891772	9/11/2019 19:00	10510
Dengue 2	Asia	MF940236	30/10/2019 19:00	10716
Dengue 2	Asia	MF940237	30/10/2019 19:00	10716
Dengue 2	Asia	MF940238	30/10/2019 19:00	10716
Dengue 2	Asia	MF940239	30/10/2019 19:00	10716
Dengue 2	Asia	MF940240	30/10/2019 19:00	10716
Dengue 2	Asia	MF940241	30/10/2019 19:00	10716
Dengue 2	Asia	MF940242	30/10/2019 19:00	10716
Dengue 2	Asia	MF940243	30/10/2019 19:00	10716
Dengue 2	Asia	MF940244	30/10/2019 19:00	10716
Dengue 2	Asia	MF940245	30/10/2019 19:00	10716
Dengue 2	Asia	MF940246	30/10/2019 19:00	10716
Dengue 2	Asia	MF940247	30/10/2019 19:00	10716
Dengue 2	Asia	MF940248	30/10/2019 19:00	10716
Dengue 2	Asia	MF940249	30/10/2019 19:00	10716
Dengue 2	Asia	MF940250	30/10/2019 19:00	10716

Dengue 2	Asia	MF940251	30/10/2019 19:00	10716
Dengue 2	Asia	MF940252	30/10/2019 19:00	10716
Dengue 2	Asia	MF940253	30/10/2019 19:00	10716
Dengue 2	Asia	MG592698	13/9/2019 19:00	10594
Dengue 2	Asia	MK411558	11/8/2019 19:00	10696
Dengue 2	Asia	MK411559	11/8/2019 19:00	10676
Dengue 2	Asia	MH827525	30/7/2019 19:00	10724
Dengue 2	Asia	MH827526	30/7/2019 19:00	10724
Dengue 2	Asia	MH827527	30/7/2019 19:00	10724
Dengue 2	Asia	MH827528	30/7/2019 19:00	10724
Dengue 2	Asia	MH827529	30/7/2019 19:00	10724
Dengue 2	Asia	MH827530	30/7/2019 19:00	10724
Dengue 2	Asia	MH827531	30/7/2019 19:00	10724
Dengue 2	Asia	MH827532	30/7/2019 19:00	10724
Dengue 2	Asia	MH827533	30/7/2019 19:00	10724
Dengue 2	Asia	MH827534	30/7/2019 19:00	10724
Dengue 2	Asia	MH827535	30/7/2019 19:00	10724
Dengue 2	Asia	MH827536	30/7/2019 19:00	10724
Dengue 2	Asia	MH827537	30/7/2019 19:00	10724
Dengue 2	Asia	MH827538	30/7/2019 19:00	10724
Dengue 2	Asia	MH827539	30/7/2019 19:00	10724
Dengue 2	Asia	MH827540	30/7/2019 19:00	10724
Dengue 2	Asia	MH827541	30/7/2019 19:00	10724
Dengue 2	Asia	MH827542	30/7/2019 19:00	10724
Dengue 2	Asia	MH827543	30/7/2019 19:00	10724
Dengue 2	Asia	MH827544	30/7/2019 19:00	10724
Dengue 2	Asia	MH827545	30/7/2019 19:00	10724
Dengue 2	Asia	MH827546	30/7/2019 19:00	10724
Dengue 2	Asia	MH827547	30/7/2019 19:00	10724
Dengue 2	Asia	MH827548	30/7/2019 19:00	10724
Dengue 2	Asia	MH827549	30/7/2019 19:00	10724
Dengue 2	Asia	MH827550	30/7/2019 19:00	10724
Dengue 2	Asia	MH827551	30/7/2019 19:00	10724
Dengue 2	Asia	MH827552	30/7/2019 19:00	10724
Dengue 2	Asia	MH827553	30/7/2019 19:00	10724
Dengue 2	Asia	MH827554	30/7/2019 19:00	10724
Dengue 2	Asia	MK543448	26/3/2019 19:00	10716
Dengue 2	Asia	MK543449	26/3/2019 19:00	10716
Dengue 2	Asia	MK543450	26/3/2019 19:00	10716
Dengue 2	Asia	MK543471	26/3/2019 19:00	10716
Dengue 2	Asia	MK543479	26/3/2019 19:00	10716
Dengue 2	Asia	MK513444	12/3/2019 19:00	10723
Dengue 2	Asia	KY672945	19/2/2019 19:00	10723
Dengue 2	Asia	KY672946	19/2/2019 19:00	10723
Dengue 2	Asia	KY672947	19/2/2019 19:00	10723
Dengue 2	Asia	KY672948	19/2/2019 19:00	10723

Dengue 2	Asia	KY672949	19/2/2019 19:00	10723
Dengue 2	Asia	KY672950	19/2/2019 19:00	10723
Dengue 2	Asia	KY672951	19/2/2019 19:00	10680
Dengue 2	Asia	KY672952	19/2/2019 19:00	10668
Dengue 2	Asia	KY672953	19/2/2019 19:00	10665
Dengue 2	Asia	KY672954	19/2/2019 19:00	10665
Dengue 2	Asia	KY672955	19/2/2019 19:00	10723
Dengue 2	Asia	MH823208	17/2/2019 19:00	10723
Dengue 2	Asia	MH888331	9/2/2019 19:00	10461
Dengue 2	Asia	MH010629	8/1/2019 19:00	10690
Dengue 2	Asia	MG721054	31/12/2018 19:00	10723
Dengue 2	Asia	MG721055	31/12/2018 19:00	10726
Dengue 2	Asia	MG721056	31/12/2018 19:00	10723
Dengue 2	Asia	MG721057	31/12/2018 19:00	10555
Dengue 2	Asia	MG721058	31/12/2018 19:00	10723
Dengue 2	Asia	MG721062	31/12/2018 19:00	10572
Dengue 2	Asia	MH822939	30/12/2018 19:00	10611
Dengue 2	Asia	MH822940	30/12/2018 19:00	10589
Dengue 2	Asia	MH822941	30/12/2018 19:00	10589
Dengue 2	Asia	MH822942	30/12/2018 19:00	10617
Dengue 2	Asia	MH822943	30/12/2018 19:00	10485
Dengue 2	Asia	MH822944	30/12/2018 19:00	10718
Dengue 2	Asia	MH822945	30/12/2018 19:00	10564
Dengue 2	Asia	MH822946	30/12/2018 19:00	10596
Dengue 2	Asia	MH822947	30/12/2018 19:00	10649
Dengue 2	Asia	MH822948	30/12/2018 19:00	10695
Dengue 2	Asia	MH822949	30/12/2018 19:00	10719
Dengue 2	Asia	MH822950	30/12/2018 19:00	10551
Dengue 2	Asia	MH822951	30/12/2018 19:00	10574
Dengue 2	Asia	MH822952	30/12/2018 19:00	10574
Dengue 2	Asia	MH822953	30/12/2018 19:00	10558
Dengue 2	Asia	MH822954	30/12/2018 19:00	10608
Dengue 2	Asia	MH822955	30/12/2018 19:00	10607
Dengue 2	Asia	MH822956	30/12/2018 19:00	10625
Dengue 2	Asia	MG560143	7/10/2018 19:00	10723
Dengue 2	Asia	MG560144	7/10/2018 19:00	10670
Dengue 2	Asia	MH110564	9/9/2018 19:00	10176
Dengue 2	Asia	MH110565	9/9/2018 19:00	10176
Dengue 2	Asia	MH110566	9/9/2018 19:00	10176
Dengue 2	Asia	MH110567	9/9/2018 19:00	10176
Dengue 2	Asia	MH110568	9/9/2018 19:00	10176
Dengue 2	Asia	MH110569	9/9/2018 19:00	10176
Dengue 2	Asia	MH110570	9/9/2018 19:00	10176
Dengue 2	Asia	MH110571	9/9/2018 19:00	10176
Dengue 2	Asia	MH110572	9/9/2018 19:00	10176
Dengue 2	Asia	MH110573	9/9/2018 19:00	10176

Dengue 2	Asia	MH110574	9/9/2018 19:00	10176
Dengue 2	Asia	MH110575	9/9/2018 19:00	10176
Dengue 2	Asia	MH110576	9/9/2018 19:00	10176
Dengue 2	Asia	MH110577	9/9/2018 19:00	10176
Dengue 2	Asia	MH110578	9/9/2018 19:00	10176
Dengue 2	Asia	MH110579	9/9/2018 19:00	10176
Dengue 2	Asia	MH110580	9/9/2018 19:00	10176
Dengue 2	Asia	MH110581	9/9/2018 19:00	10176
Dengue 2	Asia	MH110582	9/9/2018 19:00	10176
Dengue 2	Asia	MH110583	9/9/2018 19:00	10176
Dengue 2	Asia	MH110584	9/9/2018 19:00	10176
Dengue 2	Asia	MH110585	9/9/2018 19:00	10176
Dengue 2	Asia	MH110586	9/9/2018 19:00	10176
Dengue 2	Asia	MH110587	9/9/2018 19:00	10176
Dengue 2	Asia	MH110588	9/9/2018 19:00	10176
Dengue 2	Asia	MH110589	9/9/2018 19:00	10176
Dengue 2	Asia	MH110590	9/9/2018 19:00	10176
Dengue 2	Asia	MH110591	9/9/2018 19:00	10176
Dengue 2	Asia	MH110592	9/9/2018 19:00	10176
Dengue 2	Asia	MH110593	9/9/2018 19:00	10176
Dengue 2	Asia	MH110594	9/9/2018 19:00	10176
Dengue 2	Asia	MH110595	9/9/2018 19:00	10176
Dengue 2	Asia	MH110596	9/9/2018 19:00	10176
Dengue 2	Asia	MH110597	9/9/2018 19:00	10176
Dengue 2	Asia	MH110598	9/9/2018 19:00	10176
Dengue 2	Asia	MH110599	9/9/2018 19:00	10176
Dengue 2	Asia	MH110600	9/9/2018 19:00	10176
Dengue 2	Asia	MH110601	9/9/2018 19:00	10176
Dengue 2	Asia	MH110602	9/9/2018 19:00	10176
Dengue 2	Asia	MH110603	9/9/2018 19:00	10176
Dengue 2	Asia	MF314189	13/5/2018 19:00	10594
Dengue 2	Asia	MF043956	6/4/2018 19:00	10723
Dengue 2	Asia	KY937185	13/8/2017 19:00	10742
Dengue 2	Asia	KY937186	13/8/2017 19:00	10742
Dengue 2	Asia	KY937187	13/8/2017 19:00	10742
Dengue 2	Asia	KY937188	13/8/2017 19:00	10741
Dengue 2	Asia	KY937189	13/8/2017 19:00	10734
Dengue 2	Asia	KY937190	13/8/2017 19:00	10741
Dengue 2	Asia	MF459663	30/7/2017 19:00	10724
Dengue 2	Asia	KY923048	29/5/2017 19:00	10737
Dengue 2	Asia	KY427084	8/5/2017 19:00	10723
Dengue 2	Asia	KY427085	8/5/2017 19:00	10723
Dengue 2	Asia	KY921904	5/5/2017 19:00	10723
Dengue 2	Asia	KY921905	5/5/2017 19:00	10723
Dengue 2	Asia	KX621245	21/2/2017 19:00	10681
Dengue 2	Asia	KX621246	21/2/2017 19:00	10681

Dengue 2	Asia	KX621247	21/2/2017 19:00	10681
Dengue 2	Asia	KX621248	21/2/2017 19:00	10681
Dengue 2	Asia	KX655786	21/2/2017 19:00	10653
Dengue 2	Asia	KX655787	21/2/2017 19:00	10635
Dengue 2	Asia	KX655788	21/2/2017 19:00	10668
Dengue 2	Asia	KU509273	24/1/2017 19:00	10543
Dengue 2	Asia	KU509274	24/1/2017 19:00	10540
Dengue 2	Asia	KU509277	24/1/2017 19:00	10551
Dengue 2	Asia	KX225485	22/1/2017 19:00	10668
Dengue 2	Asia	KX225486	22/1/2017 19:00	10631
Dengue 2	Asia	KU517846	22/7/2016 19:00	10723
Dengue 2	Asia	KU517847	22/7/2016 19:00	10723
Dengue 2	Asia	KU948303	19/7/2016 19:00	10707
Dengue 2	Asia	KT187553	24/11/2015 19:00	10723
Dengue 2	Asia	KT187554	24/11/2015 19:00	10723
Dengue 2	Asia	KT187555	24/11/2015 19:00	10723
Dengue 2	Asia	KT187556	24/11/2015 19:00	10723
Dengue 2	Asia	KT187557	24/11/2015 19:00	10723
Dengue 2	Asia	KT187558	24/11/2015 19:00	10723
Dengue 2	Asia	KM217156	23/10/2015 19:00	10656
Dengue 2	Asia	KM217157	23/10/2015 19:00	10656
Dengue 2	Asia	KM217158	23/10/2015 19:00	10656
Dengue 2	Asia	KP723478	20/7/2015 19:00	10583
Dengue 2	Asia	KP723479	20/7/2015 19:00	10723
Dengue 2	Asia	KJ701507	1/7/2015 19:00	10656
Dengue 2	Asia	KR779786	14/6/2015 19:00	10723
Dengue 2	Asia	KM279515	3/4/2015 19:00	10723
Dengue 2	Asia	KM279517	3/4/2015 19:00	10723
Dengue 2	Asia	KM279518	3/4/2015 19:00	10723
Dengue 2	Asia	KM279519	3/4/2015 19:00	10723
Dengue 2	Asia	KM279520	3/4/2015 19:00	10723
Dengue 2	Asia	KM279521	3/4/2015 19:00	10723
Dengue 2	Asia	KM279522	3/4/2015 19:00	10723
Dengue 2	Asia	KM279523	3/4/2015 19:00	10723
Dengue 2	Asia	KM279524	3/4/2015 19:00	10723
Dengue 2	Asia	KM279525	3/4/2015 19:00	10723
Dengue 2	Asia	KM279526	3/4/2015 19:00	10723
Dengue 2	Asia	KM279528	3/4/2015 19:00	10723
Dengue 2	Asia	KM279530	3/4/2015 19:00	10723
Dengue 2	Asia	KM279532	3/4/2015 19:00	10723
Dengue 2	Asia	KM279533	3/4/2015 19:00	10723
Dengue 2	Asia	KM279534	3/4/2015 19:00	10723
Dengue 2	Asia	KM279535	3/4/2015 19:00	10723
Dengue 2	Asia	KM279536	3/4/2015 19:00	10723
Dengue 2	Asia	KM279537	3/4/2015 19:00	10723
Dengue 2	Asia	KM279538	3/4/2015 19:00	10723

Dengue 2	Asia	KM279539	3/4/2015 19:00	10723
Dengue 2	Asia	KM279540	3/4/2015 19:00	10723
Dengue 2	Asia	KM279541	3/4/2015 19:00	10723
Dengue 2	Asia	KM279542	3/4/2015 19:00	10723
Dengue 2	Asia	KM279543	3/4/2015 19:00	10723
Dengue 2	Asia	KM279544	3/4/2015 19:00	10723
Dengue 2	Asia	KM279545	3/4/2015 19:00	10723
Dengue 2	Asia	KM279546	3/4/2015 19:00	10723
Dengue 2	Asia	KM279548	3/4/2015 19:00	10723
Dengue 2	Asia	KM279549	3/4/2015 19:00	10723
Dengue 2	Asia	KM279550	3/4/2015 19:00	10723
Dengue 2	Asia	KM279551	3/4/2015 19:00	10723
Dengue 2	Asia	KM279552	3/4/2015 19:00	10723
Dengue 2	Asia	KM279553	3/4/2015 19:00	10723
Dengue 2	Asia	KM279554	3/4/2015 19:00	10723
Dengue 2	Asia	KM279555	3/4/2015 19:00	10723
Dengue 2	Asia	KM279556	3/4/2015 19:00	10723
Dengue 2	Asia	KM279557	3/4/2015 19:00	10724
Dengue 2	Asia	KM279558	3/4/2015 19:00	10723
Dengue 2	Asia	KM279559	3/4/2015 19:00	10723
Dengue 2	Asia	KM279560	3/4/2015 19:00	10723
Dengue 2	Asia	KM279561	3/4/2015 19:00	10723
Dengue 2	Asia	KM279562	3/4/2015 19:00	10723
Dengue 2	Asia	KM279563	3/4/2015 19:00	10723
Dengue 2	Asia	KM279564	3/4/2015 19:00	10723
Dengue 2	Asia	KM279565	3/4/2015 19:00	10723
Dengue 2	Asia	KM279566	3/4/2015 19:00	10723
Dengue 2	Asia	KM279567	3/4/2015 19:00	10723
Dengue 2	Asia	KM279568	3/4/2015 19:00	10723
Dengue 2	Asia	KM279569	3/4/2015 19:00	10723
Dengue 2	Asia	KM279570	3/4/2015 19:00	10723
Dengue 2	Asia	KM279571	3/4/2015 19:00	10723
Dengue 2	Asia	KM279572	3/4/2015 19:00	10723
Dengue 2	Asia	KM279573	3/4/2015 19:00	10723
Dengue 2	Asia	KM279575	3/4/2015 19:00	10723
Dengue 2	Asia	KM279576	3/4/2015 19:00	10723
Dengue 2	Asia	KM279577	3/4/2015 19:00	10723
Dengue 2	Asia	KM279578	3/4/2015 19:00	10723
Dengue 2	Asia	KM279579	3/4/2015 19:00	10723
Dengue 2	Asia	KM279581	3/4/2015 19:00	10723
Dengue 2	Asia	KM279582	3/4/2015 19:00	10723
Dengue 2	Asia	KM279586	3/4/2015 19:00	10723
Dengue 2	Asia	KM279587	3/4/2015 19:00	10723
Dengue 2	Asia	KM279588	3/4/2015 19:00	10723
Dengue 2	Asia	KM279590	3/4/2015 19:00	10723
Dengue 2	Asia	KM279591	3/4/2015 19:00	10723

Dengue 2	Asia	KM279592	3/4/2015 19:00	10723
Dengue 2	Asia	KM279593	3/4/2015 19:00	10723
Dengue 2	Asia	KM279594	3/4/2015 19:00	10723
Dengue 2	Asia	KM279595	3/4/2015 19:00	10723
Dengue 2	Asia	KM279597	3/4/2015 19:00	10723
Dengue 2	Asia	KM279598	3/4/2015 19:00	10723
Dengue 2	Asia	KM279599	3/4/2015 19:00	10723
Dengue 2	Asia	KM279600	3/4/2015 19:00	10723
Dengue 2	Asia	KM279601	3/4/2015 19:00	10723
Dengue 2	Asia	KP012546	21/2/2015 19:00	10723
Dengue 2	Asia	KC762678	16/1/2015 19:00	10723
Dengue 2	Asia	KC762679	16/1/2015 19:00	10723
Dengue 2	Asia	KC762680	16/1/2015 19:00	10723
Dengue 2	Asia	KJ830750	30/9/2014 19:00	10718
Dengue 2	Asia	KJ734727	18/5/2014 19:00	10723
Dengue 2	Asia	KJ010185	22/3/2014 19:00	10629
Dengue 2	Asia	KJ010186	22/3/2014 19:00	10629
Dengue 2	Asia	JQ955624	30/1/2014 19:00	10670
Dengue 2	Asia	KF041232	22/12/2013 19:00	10723
Dengue 2	Asia	KF041233	22/12/2013 19:00	10723
Dengue 2	Asia	KF041234	22/12/2013 19:00	10723
Dengue 2	Asia	KF360005	24/11/2013 19:00	10629
Dengue 2	Asia	KF479233	18/11/2013 19:00	10723
Dengue 2	Asia	KC131142	24/2/2013 19:00	10673
Dengue 2	Asia	JX470186	13/10/2012 19:00	10723
Dengue 2	Norteamérica	MZ008463	27/4/2021 19:00	10725
Dengue 2	Norteamérica	MZ008467	27/4/2021 19:00	10724
Dengue 2	Norteamérica	MH781013	2/4/2019 19:00	10651
Dengue 2	Norteamérica	MH781014	2/4/2019 19:00	10617
Dengue 2	Norteamérica	MH781015	2/4/2019 19:00	10705
Dengue 2	Norteamérica	MH613984	12/3/2019 19:00	10723
Dengue 2	Norteamérica	MH613985	12/3/2019 19:00	10723
Dengue 2	Norteamérica	MH613986	12/3/2019 19:00	10723
Dengue 2	Norteamérica	KY415992	27/1/2017 19:00	10724
Dengue 2	Norteamérica	KU509267	24/1/2017 19:00	10567
Dengue 2	Norteamérica	KX702403	23/8/2016 19:00	10724
Dengue 2	Norteamérica	KX702404	23/8/2016 19:00	10723
Dengue 2	Norteamérica	KM587709	22/3/2015 19:00	10713
Dengue 2	Norteamérica	KJ189309	9/2/2014 19:00	10300
Dengue 2	Norteamérica	KJ189370	9/2/2014 19:00	10481
Dengue 2	Norteamérica	HQ541799	14/6/2011 19:00	10508
Dengue 2	Oceanía	MN566111	2/10/2020 19:00	10722
Dengue 2	Oceanía	MN566112	2/10/2020 19:00	10722
Dengue 2	Oceanía	MT921571	29/8/2020 19:00	10723
Dengue 2	Oceanía	MH985858	3/11/2018 19:00	10723
Dengue 2	Oceanía	MH985859	3/11/2018 19:00	10722

Dengue 2	Oceanía	KY794785	19/2/2018 19:00	10657
Dengue 2	Oceanía	KX274130	8/8/2016 19:00	10736
Dengue 2	Oceanía	KX372564	8/8/2016 19:00	10723
Dengue 2	Oceanía	KU517845	22/7/2016 19:00	10723
Dengue 2	Sudamérica	MW577813	18/3/2021 19:00	10725
Dengue 2	Sudamérica	MW577815	18/3/2021 19:00	10725
Dengue 2	Sudamérica	MW577816	18/3/2021 19:00	10724
Dengue 2	Sudamérica	MW577817	18/3/2021 19:00	10725
Dengue 2	Sudamérica	MW577818	18/3/2021 19:00	10724
Dengue 2	Sudamérica	MW577819	18/3/2021 19:00	10724
Dengue 2	Sudamérica	MW577821	18/3/2021 19:00	10724
Dengue 2	Sudamérica	MW577822	18/3/2021 19:00	10725
Dengue 2	Sudamérica	MW577823	18/3/2021 19:00	10724
Dengue 2	Sudamérica	MW577824	18/3/2021 19:00	10724
Dengue 2	Sudamérica	MW577825	18/3/2021 19:00	10724
Dengue 2	Sudamérica	MW577830	18/3/2021 19:00	10724
Dengue 2	Sudamérica	MW577831	18/3/2021 19:00	10725
Dengue 2	Sudamérica	MW577832	18/3/2021 19:00	10723
Dengue 2	Sudamérica	MW577833	18/3/2021 19:00	10723
Dengue 2	Sudamérica	MW577834	18/3/2021 19:00	10723
Dengue 2	Sudamérica	MK517773	20/1/2020 19:00	10646
Dengue 2	Sudamérica	MN239505	12/8/2019 19:00	10664
Dengue 2	Sudamérica	MH069495	14/5/2018 19:00	10619
Dengue 2	Sudamérica	MH069496	14/5/2018 19:00	10694
Dengue 2	Sudamérica	MH069497	14/5/2018 19:00	10711
Dengue 2	Sudamérica	MH069498	14/5/2018 19:00	10704
Dengue 2	Sudamérica	MH069499	14/5/2018 19:00	10712
Dengue 2	Sudamérica	MH215277	12/5/2018 19:00	10722
Dengue 2	Sudamérica	KY474308	13/1/2018 19:00	10648
Dengue 2	Sudamérica	KY474309	13/1/2018 19:00	10648
Dengue 2	Sudamérica	KY474310	13/1/2018 19:00	10647
Dengue 2	Sudamérica	KY474311	13/1/2018 19:00	10647
Dengue 2	Sudamérica	KY474312	13/1/2018 19:00	10648
Dengue 2	Sudamérica	KY474313	13/1/2018 19:00	10648
Dengue 2	Sudamérica	KY474314	13/1/2018 19:00	10648
Dengue 2	Sudamérica	KY474315	13/1/2018 19:00	10648
Dengue 2	Sudamérica	KY474316	13/1/2018 19:00	10647
Dengue 2	Sudamérica	KY474317	13/1/2018 19:00	10647
Dengue 2	Sudamérica	KY474318	13/1/2018 19:00	10648
Dengue 2	Sudamérica	KY474319	13/1/2018 19:00	10648
Dengue 2	Sudamérica	KY474320	13/1/2018 19:00	10647
Dengue 2	Sudamérica	KY474321	13/1/2018 19:00	10647
Dengue 2	Sudamérica	KY474322	13/1/2018 19:00	10648
Dengue 2	Sudamérica	KY474323	13/1/2018 19:00	10648
Dengue 2	Sudamérica	KY474324	13/1/2018 19:00	10648
Dengue 2	Sudamérica	KY474325	13/1/2018 19:00	10648

Dengue 2	Sudamérica	KY474326	13/1/2018 19:00	10648
Dengue 2	Sudamérica	KY474327	13/1/2018 19:00	10648
Dengue 2	Sudamérica	KY474328	13/1/2018 19:00	10648
Dengue 2	Sudamérica	KY474329	13/1/2018 19:00	10648
Dengue 2	Sudamérica	KY474330	13/1/2018 19:00	10648
Dengue 2	Sudamérica	KY474331	13/1/2018 19:00	10648
Dengue 2	Sudamérica	KY474332	13/1/2018 19:00	10647
Dengue 2	Sudamérica	KY474333	13/1/2018 19:00	10648
Dengue 2	Sudamérica	KY474334	13/1/2018 19:00	10460
Dengue 2	Sudamérica	KP188551	14/7/2016 19:00	10603
Dengue 2	Sudamérica	KP188552	14/7/2016 19:00	10527
Dengue 2	Sudamérica	KP188553	14/7/2016 19:00	10403
Dengue 2	Sudamérica	KP188554	14/7/2016 19:00	10699
Dengue 2	Sudamérica	KP188555	14/7/2016 19:00	10657
Dengue 2	Sudamérica	KP188556	14/7/2016 19:00	10526
Dengue 2	Sudamérica	KP188569	14/7/2016 19:00	10420
Dengue 2	Sudamérica	KC294202	9/1/2014 19:00	10723
Dengue 2	Sudamérica	KC294203	9/1/2014 19:00	10723
Dengue 2	Sudamérica	KC294204	9/1/2014 19:00	10723
Dengue 2	Sudamérica	KC294205	9/1/2014 19:00	10723
Dengue 2	Sudamérica	KC294206	9/1/2014 19:00	10723
Dengue 2	Sudamérica	KC294207	9/1/2014 19:00	10723
Dengue 2	Sudamérica	KC294208	9/1/2014 19:00	10723
Dengue 2	Sudamérica	KC294209	9/1/2014 19:00	10723
Dengue 2	Sudamérica	KC294210	9/1/2014 19:00	10723
Dengue 2	Sudamérica	KC294211	9/1/2014 19:00	10723
Dengue 2	Sudamérica	KC294212	9/1/2014 19:00	10723
Dengue 2	Sudamérica	KC294213	9/1/2014 19:00	10723
Dengue 2	Sudamérica	KC294214	9/1/2014 19:00	10723
Dengue 2	Sudamérica	KC294215	9/1/2014 19:00	10723
Dengue 2	Sudamérica	KC294217	9/1/2014 19:00	10723
Dengue 2	Sudamérica	KC294218	9/1/2014 19:00	10723
Dengue 2	Sudamérica	KC294219	9/1/2014 19:00	10723
Dengue 2	Sudamérica	KC294220	9/1/2014 19:00	10723
Dengue 2	Sudamérica	KC294221	9/1/2014 19:00	10723
Dengue 2	Sudamérica	KC294223	9/1/2014 19:00	10723
Dengue 2	Sudamérica	JX669476	10/10/2013 19:00	10723
Dengue 2	Sudamérica	JX669477	10/10/2013 19:00	10723
Dengue 2	Sudamérica	JX669478	10/10/2013 19:00	10723
Dengue 2	Sudamérica	JX669479	10/10/2013 19:00	10726
Dengue 2	Sudamérica	JX286516	30/7/2013 19:00	10542
Dengue 2	Sudamérica	JX286517	30/7/2013 19:00	10539
Dengue 2	Sudamérica	JX286518	30/7/2013 19:00	10544
Dengue 2	Sudamérica	JX286519	30/7/2013 19:00	10540
Dengue 2	Sudamérica	JX286520	30/7/2013 19:00	10598
Dengue 2	Sudamérica	JX286521	30/7/2013 19:00	10597

Dengue 2	Sudamérica	JX286522	30/7/2013 19:00	10599
Dengue 2	Sudamérica	JX286523	30/7/2013 19:00	10611
Dengue 2	Sudamérica	JX286524	30/7/2013 19:00	10587
Dengue 2	Sudamérica	JX286525	30/7/2013 19:00	10596
Dengue 2	Sudamérica	JX286526	30/7/2013 19:00	10630
Dengue 3	África	LC379193	11/12/2019 19:00	10663
Dengue 3	África	LC379194	11/12/2019 19:00	10663
Dengue 3	África	LC379195	11/12/2019 19:00	10663
Dengue 3	África	LC379196	11/12/2019 19:00	10663
Dengue 3	África	LC379197	11/12/2019 19:00	10641
Dengue 3	Asia	MZ284953	29/5/2021 19:00	10735
Dengue 3	Asia	MZ285732	29/5/2021 19:00	10735
Dengue 3	Asia	MN253125	12/9/2020 19:00	10651
Dengue 3	Asia	LC436676	2/6/2020 19:00	10666
Dengue 3	Asia	LC436677	2/6/2020 19:00	10666
Dengue 3	Asia	MN018367	20/1/2020 19:00	10708
Dengue 3	Asia	MN018368	20/1/2020 19:00	10708
Dengue 3	Asia	MN018369	20/1/2020 19:00	10708
Dengue 3	Asia	MN018370	20/1/2020 19:00	10708
Dengue 3	Asia	MN018371	20/1/2020 19:00	10708
Dengue 3	Asia	MN018372	20/1/2020 19:00	10708
Dengue 3	Asia	MN018373	20/1/2020 19:00	10708
Dengue 3	Asia	MN018374	20/1/2020 19:00	10708
Dengue 3	Asia	MN018375	20/1/2020 19:00	10708
Dengue 3	Asia	MN018376	20/1/2020 19:00	10708
Dengue 3	Asia	MN018377	20/1/2020 19:00	10708
Dengue 3	Asia	MN018378	20/1/2020 19:00	10708
Dengue 3	Asia	MN018379	20/1/2020 19:00	10708
Dengue 3	Asia	MN018380	20/1/2020 19:00	10708
Dengue 3	Asia	MN018381	20/1/2020 19:00	10708
Dengue 3	Asia	MN018382	20/1/2020 19:00	10708
Dengue 3	Asia	MN018383	20/1/2020 19:00	10708
Dengue 3	Asia	MN018384	20/1/2020 19:00	10708
Dengue 3	Asia	MN018385	20/1/2020 19:00	10708
Dengue 3	Asia	MN018386	20/1/2020 19:00	10708
Dengue 3	Asia	MN018387	20/1/2020 19:00	10708
Dengue 3	Asia	MN018388	20/1/2020 19:00	10708
Dengue 3	Asia	MN018389	20/1/2020 19:00	10708
Dengue 3	Asia	MH891766	9/11/2019 19:00	10764
Dengue 3	Asia	MK005258	1/11/2019 19:00	10657
Dengue 3	Asia	MH823209	17/2/2019 19:00	10707
Dengue 3	Asia	MH888332	9/2/2019 19:00	10659
Dengue 3	Asia	MG721059	31/12/2018 19:00	10619
Dengue 3	Asia	MG721061	31/12/2018 19:00	10706
Dengue 3	Asia	MG721064	31/12/2018 19:00	10285
Dengue 3	Asia	MH822957	30/12/2018 19:00	10579

Dengue 3	Asia	KX855927	30/1/2018 19:00	10603
Dengue 3	Asia	MF370226	30/7/2017 19:00	10627
Dengue 3	Asia	KY863456	10/7/2017 19:00	10707
Dengue 3	Asia	KY921906	5/5/2017 19:00	10675
Dengue 3	Asia	KY921907	5/5/2017 19:00	10667
Dengue 3	Asia	KU509280	24/1/2017 19:00	10261
Dengue 3	Asia	KU509285	24/1/2017 19:00	10492
Dengue 3	Asia	KU509286	24/1/2017 19:00	10493
Dengue 3	Asia	KT424097	23/1/2017 19:00	10681
Dengue 3	Asia	KU216208	28/2/2016 19:00	10672
Dengue 3	Asia	KU216209	28/2/2016 19:00	10674
Dengue 3	Asia	KR296743	17/10/2015 19:00	10710
Dengue 3	Asia	KR296744	17/10/2015 19:00	10702
Dengue 3	Asia	KJ622191	30/3/2015 19:00	10710
Dengue 3	Asia	KC762692	16/1/2015 19:00	10707
Dengue 3	Asia	KC762693	16/1/2015 19:00	10707
Dengue 3	Asia	KJ830751	30/9/2014 19:00	10635
Dengue 3	Asia	KF954945	7/3/2014 19:00	10686
Dengue 3	Asia	KF954946	7/3/2014 19:00	10686
Dengue 3	Asia	KF954947	7/3/2014 19:00	10675
Dengue 3	Asia	KF954948	7/3/2014 19:00	10678
Dengue 3	Asia	KF954949	7/3/2014 19:00	10677
Dengue 3	Asia	KF824902	8/2/2014 19:00	10707
Dengue 3	Asia	KF824903	8/2/2014 19:00	10707
Dengue 3	Asia	HG316483	14/8/2013 19:00	10707
Dengue 3	Asia	HG316484	14/8/2013 19:00	10707
Dengue 3	Norteamérica	KF973476	19/12/2014 19:00	10696
Dengue 3	Norteamérica	KF973477	19/12/2014 19:00	10512
Dengue 3	Norteamérica	KF973478	19/12/2014 19:00	10584
Dengue 3	Norteamérica	KF973479	19/12/2014 19:00	10569
Dengue 3	Norteamérica	KF973480	19/12/2014 19:00	10569
Dengue 3	Norteamérica	KF973481	19/12/2014 19:00	10644
Dengue 3	Norteamérica	KF973482	19/12/2014 19:00	10584
Dengue 3	Norteamérica	KF973483	19/12/2014 19:00	10509
Dengue 3	Norteamérica	KF973484	19/12/2014 19:00	10578
Dengue 3	Norteamérica	KF973485	19/12/2014 19:00	10604
Dengue 3	Norteamérica	KF973486	19/12/2014 19:00	10576
Dengue 3	Norteamérica	KF973487	19/12/2014 19:00	10569
Dengue 3	Norteamérica	JN093513	14/6/2011 19:00	10690
Dengue 3	Norteamérica	JN093515	14/6/2011 19:00	10679
Dengue 3	Norteamérica	JN000937	24/5/2011 19:00	10398
Dengue 3	Norteamérica	JN000938	24/5/2011 19:00	10685
Dengue 3	Norteamérica	JF937620	17/5/2011 19:00	10681
Dengue 3	Norteamérica	JF937621	17/5/2011 19:00	10676
Dengue 3	Norteamérica	JF937622	17/5/2011 19:00	10680
Dengue 3	Norteamérica	JF937623	17/5/2011 19:00	10681

Dengue 3	Norteamérica	JF937624	17/5/2011 19:00	10681
Dengue 3	Norteamérica	JF937625	17/5/2011 19:00	10683
Dengue 3	Norteamérica	JF937626	17/5/2011 19:00	10691
Dengue 3	Norteamérica	JF937627	17/5/2011 19:00	10527
Dengue 3	Norteamérica	JF937628	17/5/2011 19:00	10684
Dengue 3	Norteamérica	JF937629	17/5/2011 19:00	10683
Dengue 3	Norteamérica	JF937633	17/5/2011 19:00	10683
Dengue 3	Norteamérica	JF937634	17/5/2011 19:00	10681
Dengue 3	Norteamérica	JF937637	17/5/2011 19:00	10689
Dengue 3	Norteamérica	JF937638	17/5/2011 19:00	10681
Dengue 3	Norteamérica	JF937639	17/5/2011 19:00	10644
Dengue 3	Norteamérica	JF937640	17/5/2011 19:00	10678
Dengue 3	Norteamérica	JF937646	17/5/2011 19:00	10681
Dengue 3	Norteamérica	JF937648	17/5/2011 19:00	10680
Dengue 3	Norteamérica	JF920397	16/5/2011 19:00	10676
Dengue 3	Norteamérica	JF920401	16/5/2011 19:00	10681
Dengue 3	Norteamérica	JF920405	16/5/2011 19:00	10681
Dengue 3	Norteamérica	JF920406	16/5/2011 19:00	10681
Dengue 3	Norteamérica	JF920408	16/5/2011 19:00	10681
Dengue 3	Norteamérica	JF920409	16/5/2011 19:00	10680
Dengue 3	Oceanía	KY794786	19/2/2018 19:00	10643
Dengue 3	Sudamérica	MH888333	9/2/2019 19:00	10683
Dengue 3	Sudamérica	MH544647	30/7/2018 19:00	10707
Dengue 3	Sudamérica	MH544649	30/7/2018 19:00	10707
Dengue 3	Sudamérica	MH544650	30/7/2018 19:00	10708
Dengue 3	Sudamérica	MH544651	30/7/2018 19:00	10706
Dengue 4	África	MT076955	13/7/2020 19:00	10648
Dengue 4	Asia	MZ285058	29/5/2021 19:00	10723
Dengue 4	Asia	MW793459	27/3/2021 19:00	10648
Dengue 4	Asia	MW793460	27/3/2021 19:00	10648
Dengue 4	Asia	MN018390	20/1/2020 19:00	10652
Dengue 4	Asia	MN018391	20/1/2020 19:00	10652
Dengue 4	Asia	MN018392	20/1/2020 19:00	10652
Dengue 4	Asia	MN018393	20/1/2020 19:00	10652
Dengue 4	Asia	MN018394	20/1/2020 19:00	10652
Dengue 4	Asia	MN018395	20/1/2020 19:00	10652
Dengue 4	Asia	MN018396	20/1/2020 19:00	10652
Dengue 4	Asia	MN018397	20/1/2020 19:00	10652
Dengue 4	Asia	MN018398	20/1/2020 19:00	10652
Dengue 4	Asia	MH891769	9/11/2019 19:00	10403
Dengue 4	Asia	KY672956	19/2/2019 19:00	10661
Dengue 4	Asia	KY672957	19/2/2019 19:00	10661
Dengue 4	Asia	KY672958	19/2/2019 19:00	10661
Dengue 4	Asia	KY672959	19/2/2019 19:00	10661
Dengue 4	Asia	KY672960	19/2/2019 19:00	10661
Dengue 4	Asia	MH823210	17/2/2019 19:00	10648

Dengue 4	Asia	MH888334	9/2/2019 19:00	10605
Dengue 4	Asia	MG272272	13/4/2018 19:00	10652
Dengue 4	Asia	MG272273	13/4/2018 19:00	10652
Dengue 4	Asia	MG272274	13/4/2018 19:00	10652
Dengue 4	Asia	MG601754	13/2/2018 19:00	10772
Dengue 4	Asia	KY451945	12/8/2017 19:00	10616
Dengue 4	Asia	KY921909	5/5/2017 19:00	10605
Dengue 4	Asia	KY921910	5/5/2017 19:00	10602
Dengue 4	Asia	KX845005	31/3/2017 19:00	10647
Dengue 4	Asia	KU509288	24/1/2017 19:00	10500
Dengue 4	Asia	KU523871	2/8/2016 19:00	10589
Dengue 4	Asia	KU523872	2/8/2016 19:00	10653
Dengue 4	Asia	KX224312	22/6/2016 19:00	10652
Dengue 4	Asia	LC069810	1/2/2016 19:00	10623
Dengue 4	Asia	KP723482	20/7/2015 19:00	10653
Dengue 4	Asia	KP792537	14/6/2015 19:00	10651
Dengue 4	Asia	KC333651	14/4/2013 19:00	10574
Dengue 4	Asia	JX024757	3/3/2013 19:00	10653
Dengue 4	Asia	JX024758	3/3/2013 19:00	10653
Dengue 4	Asia	JQ822247	4/6/2012 19:00	10653
Dengue 4	Asia	JF741967	30/3/2012 19:00	10631
Dengue 4	Norteamérica	MN192436	28/4/2020 19:00	10650
Dengue 4	Norteamérica	MK514144	9/4/2019 19:00	10649
Dengue 4	Norteamérica	KT276273	20/10/2015 19:00	10649
Dengue 4	Oceanía	MH382789	31/7/2018 19:00	10653
Dengue 4	Sudamérica	KY474335	13/1/2018 19:00	10642
Dengue 4	Sudamérica	KP188557	14/7/2016 19:00	10425
Dengue 4	Sudamérica	KP188558	14/7/2016 19:00	10572
Dengue 4	Sudamérica	KP188559	14/7/2016 19:00	10372
Dengue 4	Sudamérica	KP188560	14/7/2016 19:00	10576
Dengue 4	Sudamérica	KP188561	14/7/2016 19:00	10438
Dengue 4	Sudamérica	KP188562	14/7/2016 19:00	10649
Dengue 4	Sudamérica	KP188563	14/7/2016 19:00	10654
Dengue 4	Sudamérica	KP188564	14/7/2016 19:00	10618
Dengue 4	Sudamérica	KP188565	14/7/2016 19:00	10355
Dengue 4	Sudamérica	KP188566	14/7/2016 19:00	10426
Dengue 4	Sudamérica	KU513441	19/6/2016 19:00	10650
Dengue 4	Sudamérica	KT794007	15/3/2016 19:00	10649
Dengue 4	Sudamérica	KJ579240	24/9/2015 19:00	10649
Dengue 4	Sudamérica	KJ579241	24/9/2015 19:00	10649
Dengue 4	Sudamérica	KJ579242	24/9/2015 19:00	10649
Dengue 4	Sudamérica	KJ579243	24/9/2015 19:00	10649
Dengue 4	Sudamérica	KJ579244	24/9/2015 19:00	10649
Dengue 4	Sudamérica	KJ579245	24/9/2015 19:00	10649
Dengue 4	Sudamérica	KJ579246	24/9/2015 19:00	10649
Dengue 4	Sudamérica	KJ579247	24/9/2015 19:00	10650

Dengue 4	Sudamérica	KJ579248	24/9/2015 19:00	10649
Dengue 4	Sudamérica	KJ596658	24/9/2015 19:00	10649
Dengue 4	Sudamérica	KJ596659	24/9/2015 19:00	10649
Dengue 4	Sudamérica	KJ596660	24/9/2015 19:00	10649
Dengue 4	Sudamérica	KJ596661	24/9/2015 19:00	10649
Dengue 4	Sudamérica	KJ596662	24/9/2015 19:00	10649
Dengue 4	Sudamérica	KJ596663	24/9/2015 19:00	10649
Dengue 4	Sudamérica	KJ596664	24/9/2015 19:00	10649
Dengue 4	Sudamérica	KJ596665	24/9/2015 19:00	10649
Dengue 4	Sudamérica	KJ596666	24/9/2015 19:00	10649
Dengue 4	Sudamérica	KJ596667	24/9/2015 19:00	10649
Dengue 4	Sudamérica	KJ596668	24/9/2015 19:00	10649
Dengue 4	Sudamérica	KJ596669	24/9/2015 19:00	10649
Dengue 4	Sudamérica	KJ596670	24/9/2015 19:00	10649
Dengue 4	Sudamérica	KJ596671	24/9/2015 19:00	10649
Dengue 4	Sudamérica	KJ596672	24/9/2015 19:00	10649
Dengue 4	Sudamérica	KJ596673	24/9/2015 19:00	10649
Dengue 4	Sudamérica	KJ596674	24/9/2015 19:00	10649
Dengue 4	Sudamérica	JQ513330	20/11/2012 19:00	10604
Dengue 4	Sudamérica	JQ513331	20/11/2012 19:00	10604
Dengue 4	Sudamérica	JQ513332	20/11/2012 19:00	10604
Dengue 4	Sudamérica	JQ513333	20/11/2012 19:00	10604
Dengue 4	Sudamérica	JQ513334	20/11/2012 19:00	10604
Dengue 4	Sudamérica	JQ513335	20/11/2012 19:00	10604
Dengue 4	Sudamérica	JQ513336	20/11/2012 19:00	10604
Dengue 4	Sudamérica	JQ513337	20/11/2012 19:00	10604
Dengue 4	Sudamérica	JQ513338	20/11/2012 19:00	10604
Dengue 4	Sudamérica	JQ513339	20/11/2012 19:00	10604
Dengue 4	Sudamérica	JQ513340	20/11/2012 19:00	10604
Dengue 4	Sudamérica	JQ513341	20/11/2012 19:00	10604
Dengue 4	Sudamérica	JQ513342	20/11/2012 19:00	10604
Dengue 4	Sudamérica	JQ513343	20/11/2012 19:00	10604
Dengue 4	Sudamérica	JQ513344	20/11/2012 19:00	10604
Dengue 4	Sudamérica	JQ513345	20/11/2012 19:00	10604
Dengue 4	Sudamérica	JN983813	21/1/2012 19:00	10649
Dengue 4	Sudamérica	JN559741	25/12/2011 19:00	10604