



FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS AGROPECUARIAS

TIPIFICACIÓN DE LOS SEROTIPOS DEL VIRUS DEL DENGUE EN
MOSQUITOS *Aedes aegypti* COLECTADOS EN DIFERENTES LOCALIDADES
DEL ECUADOR

Trabajo de Titulación presentado en conformidad con los requisitos
establecidos para optar por el título de Ingeniera en Biotecnología

Profesor Guía

M.Sc. Sara Gabriela Cifuentes Rodríguez

Autora

Gabriela Carolina Jaramillo Ayala

Año

2016

DECLARACIÓN DEL PROFESOR GUÍA

“Declaro haber dirigido este trabajo a través de reuniones periódicas con el estudiante, orientando sus conocimientos para un adecuado desarrollo del tema escogido, y dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación”.

Sara Gabriela Cifuentes Rodríguez

Magíster en Microbiología

C.I.: 100294275-1

DECLARACION DE AUTORIA DEL ESTUDIANTE

“Declaro que este trabajo es original, de mi autoría, que se han citado las fuentes correspondientes y que en su ejecución se respetaron las disposiciones legales que protegen los derechos de autor vigentes”.

Gabriela Carolina Jaramillo Ayala

C.I.: 171393011-1

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mis mejores amigas Carolina y Daniela por su compañía y cooperación. A la Dra. Varsovia Cevallos por su colaboración. A la Dra. Sara Cifuentes por guiarme a través del desarrollo de este proyecto con su conocimiento, paciencia, dedicación y sobre todo por la amistad y confianza que supo brindarme. Al Dr. Manuel Baldeón por permitirme desarrollar mi proyecto de titulación en el laboratorio. Por último, a mi novio y compañeros, que gracias a su contribución se me hizo posible culminar este proyecto.

DEDICATORIA

Este proyecto está dedicado a mis padres, que gracias a su apoyo incondicional, hicieron posible mi formación profesional. Además de sembrar en mí los valores de responsabilidad y respeto.

RESUMEN

El dengue es un problema de salud pública a nivel mundial, tanto en zonas tropicales como en subtropicales. Es una enfermedad que causa aproximadamente 50 millones de casos anuales en todo el mundo y no posee tratamiento específico. La vigilancia virológica basada en el vector es una herramienta necesaria para fortalecer el sistema de vigilancia de una enfermedad y contribuye al desarrollo de un sistema de alerta temprana capaz de generar predicciones con mayor eficiencia. Dado que el sistema de vigilancia ecuatoriano lleva a cabo únicamente vigilancia pasiva del dengue, éste posee grandes debilidades para identificar eficazmente serotipos circulantes durante períodos inter-epidémicos. El objetivo de este estudio fue identificar los diferentes serotipos en vectores colectados en las localidades de Nueva Loja, en la provincia de Sucumbíos y Esmeraldas, en la provincia de Esmeraldas, mediante la extracción de RNA total y amplificación por RT-PCR. En la fase de campo se visitaron 1010 casas, en las cuales se recolectaron 167 hembras *Ae. aegypti* en Agosto y Diciembre del 2014, y en Mayo del 2015. Se evidenció que el 7.9% del total de casas visitadas presentaron el vector, de los cuales el 9.5% fueron positivos para DENV. Los cuatro serotipos (DENV-1, DENV-2, DENV-3 y DENV-4) fueron detectados en éste estudio, con una mayor prevalencia de DENV-1 (50%), además de la co-infección de un individuo con DENV-1 y 4. DENV-3 fue identificado en uno de los vectores colectados en el 2015 mismo año en el que el MSP no lo reportó a nivel nacional. Este estudio demostró la importancia de la vigilancia virológica activa basada en el vector al encontrar algunas debilidades en el sistema de vigilancia nacional. Mientras el serotipo DENV-3 fue identificado en hembras *Ae. aegypti*, el sistema de vigilancia nacional basada en casos clínicos no lo reportó.

ABSTRACT

Dengue is considered a public health problem around the world, in both, tropical and subtropical areas. It is a disease that causes about 50 million cases annually worldwide and possesses no specific treatment. Virological surveillance based on a vector is a necessary tool to strengthen the surveillance system of a disease, and it also contributes to the development of an early warning system able to generate predictions with more efficiency. Since the Ecuadorian surveillance system performs only passive surveillance of dengue, it has great weaknesses for identifying effectively circulating serotypes during inter-epidemic periods. The aim of this study was to identify different serotypes in vectors collected in the towns of Nueva Loja, in the province of Sucumbíos and Esmeraldas, in the province of Esmeraldas, by extracting total RNA and RT-PCR amplification. In the field phase, 1010 houses were visited, of which 167 females *Ae. aegypti* were collected in August and December 2014, and May 2015. We evidenced that 7.9% of all the households had vectors, of which 9.5% were positive for DENV. The four serotypes (DENV-1, DENV-2, DENV-3 y DENV-4) were detected in this study, were DENV-1 (50%) shown a higher prevalence, plus a co-infection of an individual with DENV-1 and 4. DENV-3 was identified in one of the vectors collected in 2015, the same year in which the MSP didn't report it nationwide. This study demonstrated the significance of active virological surveillance based on the vector due to some weaknesses found in the national surveillance system. While DENV-3 was identified in female *Ae. aegypti*, the national surveillance system, based on clinical cases, didn't report it.

ÍNDICE

1. CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Antecedentes.....	1
1.2. Formulación del Problema.....	3
1.3. Justificación del Problema.....	5
1.4. Objetivos.....	7
1.4.1. Objetivo General.....	7
1.4.2. Objetivos Específicos.....	7
2. CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO.....	8
2.1. Virus Dengue.....	8
2.2. Vector.....	11
2.2.1. Comportamiento.....	13
2.2.2. Capacidad y competencia vectorial.....	15
2.2.3. Transmisión del Virus del Dengue.....	16
2.3. Inmunopatogénesis y manifestaciones clínicas.....	18
2.4. Epidemiología.....	22
2.5. Vigilancia del dengue.....	25
2.5.1. Vigilancia Epidemiológica.....	26
2.5.2. Vigilancia Entomológica.....	26
2.5.3. Vigilancia Clínica.....	26
2.5.4. Vigilancia Serológica.....	27
2.5.5. Vigilancia Viroológica.....	27
3. CAPÍTULO III. METODOLOGÍA.....	28
3.1. Zona de Estudio.....	28
3.2. Procedimientos.....	29
3.2.1. Fase de campo.....	29
3.2.2. Fase de laboratorio.....	31

4. CAPÍTULO IV. Resultados y discusión	38
4.1. Colección de mosquitos en el campo	38
4.2. Tipificación de los serotipos del DENV	41
4.3. Discusión	43
5. CAPÍTULO V. CONCLUSIONES	50
6. CAPÍTULO VI. RECOMENDACIONES	51
REFERENCIAS	52
ANEXOS	66

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Marco de lectura del virus. Tomado de Ángel, 2006, p.40.	10
Figura 2. Esquema de Aedes aegypti hembra.	12
Figura 3. Gráfico Aedes aegypti hembra y macho.	13
Figura 4. Ciclo selvático y ciclo urbano del dengue.....	17
Figura 5. Clasificación del dengue según el nivel de gravedad.....	20
Figura 6. Localización geográfica de las provincias y sus capitales, del Ecuador.....	28
Figura 7. Tamaño de la muestra para Esmeraldas.	38
Figura 8. Tamaño de la muestra para Nueva Loja.	39
Figura 9. Productos de la amplificación de los mosquitos con sobrenadante de cultivo celular infectado con DENV.	42
Figura 10. Número de serotipos identificados en dos zonas geográficas del Ecuador.	43

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Distribución mundial de los genotipos que componen los cuatro serotipos del DENV.	9
Tabla 2. Clasificación taxonómica del vector del DENV.	11
Tabla 3. Casos de dengue y dengue grave confirmados en las semanas epidemiológicas 1 a 39 en el Ecuador.	25
Tabla 4. Localidades a estudiar en el proyecto SATVEC.	30
Tabla 5. Secuencias de los cebadores utilizados para identificar los diferentes serotipos.	33
Tabla 6. Volúmenes utilizados para amplificar las muestras.	34
Tabla 7. Programa utilizado en la amplificación.	34
Tabla 8. Vigilancia del virus dengue en hembras <i>Aedes aegypti</i> recolectadas en Nueva Loja y Esmeraldas.	40
Tabla 9. Número de mosquitos <i>Aedes aegypti</i> recolectados en las diferentes temporadas del año.	41

1. CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN

1.1. Antecedentes

El dengue es una enfermedad viral transmitida por vectores, ampliamente distribuida en las zonas tropicales y subtropicales de todo el mundo, con predilección de las áreas urbanas y periurbanas (Organización Mundial de la Salud (OMS), 2016). Su agente etiológico es el virus del dengue (DENV) que pertenece al género *Flavivirus*. Existen cuatro serotipos (DENV-1, DENV-2, DENV-3 y DENV-4) responsables de causar la enfermedad, los cuales co-circulan en zonas hiperendémicas. El DENV se transmite a través de un vector del género *Aedes*, principalmente por la especie *Ae. aegypti*; sin embargo, la especie *Aedes albopictus* también lo transmite, pero con menor frecuencia (Velandia y Castellanos, 2011, p.33). Se considera un vector doméstico de aguas limpias, diurno y antropofílico. (González, 2001, p.43). Estos vectores se encuentran en casi 100 países tropicales, cubriendo la mayor parte del mundo (Acosta y Gómez, 2005, p.116).

Debido a la expansión del dengue hacia nuevas zonas geográficas, su incidencia ha aumentado 30 veces en los últimos 50 años. Además, en la década actual se ha expandido de áreas urbanas a rurales (Romero, 2012, p.1). Se considera que 2.5 mil millones de personas habitan en áreas donde el dengue es endémico y cada año se notifican al menos 50 millones de casos (OMS, 2009). Según datos oficiales presentados por la Organización Panamericana de la Salud (OPS), al cierre del año 2014 hubieron 1,176,529 casos de dengue en las Américas, manteniendo una tasa de letalidad del 0.06% en cuanto al año 2013, el cual present un mayor número de casos pero el porcentaje de letalidad se mantuvo (Organización Panamericana de la Salud (OPS), 2015). Latinoamérica está inmersa en una situación de hiperendemicidad, en donde la última epidemia de gran magnitud sucedió en el 2010. Según la OPS, 1.8 millones de personas adquirieron la enfermedad y 1.167 perecieron ante ella (Romero, 2012, p.2).

La zona Andina (Ecuador, Colombia, Bolivia, Perú y Venezuela) es la segunda región con el mayor número de casos notificados de dengue, hasta el año 2015 se notificaron 270.350 casos de todos los que se reportaron en las Américas (OPS, 2016). En el Ecuador, el dengue es endémico, y por lo general predomina en la temporada de precipitaciones en las provincias de la Costa y la Amazonía (OPS, 2012). Después de la introducción del serotipo 1 en el país en 1988, se registró el primer brote de la enfermedad y a continuación ocurrió la introducción del serotipo 2 en 1990. En 1993, el serotipo 4 fue registrado por primera vez y para el año 2000 se notificó la circulación del serotipo 3, momento en el cual el Ecuador ya tenía los 4 serotipos circulando simultáneamente. En ese mismo año fue registrado el pico más alto de casos de dengue que el país haya enfrentado hasta la fecha (Aguirre, 2004, p.24; OPS, 1995).

Desde el último brote más importante de dengue en el Ecuador, la tendencia de la enfermedad, basada en reportes oficiales, ha sido típicamente oscilatoria durante los últimos 13 años. A pesar de las medidas locales para controlar la expansión del vector los casos de dengue no muestran una remisión. Hasta la semana epidemiológica Nro. 52 del año 2013 se reportaron 13.630 casos de dengue (OPS, 2013); de estos, la costa reportó el 73% de los casos, el oriente el 18% y la sierra 9% (Ministerio de Salud Pública (MSP), 2013). Debido a la falta de disponibilidad de una vacuna que pueda proteger a la población (Guzmán et al., 2006, p.204), son necesarias las intervenciones para el control del vector y el estudio de la dinámica de *Aedes egypti* (Ibarra et al., 2013, p.1-11), de modo que se pueda controlar y reducir la transmisión de la enfermedad. Basado en ésta problemática, el Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública (INSPI), a partir de Septiembre del 2012, inició un programa entomológico llamado Sistema Nacional de Vigilancia y Alerta Temprana para el Control del Vector de Dengue y Fiebre Amarilla (SATVEC) en el Ecuador; el objetivo principal es recabar información biológica del mosquito *Ae. aegypti* climatológica y socioeconómica, para que junto a sistemas de información geográfica se pueda implementar en el futuro un sistema de alerta temprana

para el control del vector de dengue y fiebre amarilla de forma más eficiente (Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública (INSPI), 2016). El presente estudio forma parte del programa SATVEC, enfocado en la identificación de los serotipos de dengue en los mosquitos colectados en el campo.

1.2. Formulación del Problema

El dengue se expande rápidamente por las zonas urbanas de los trópicos y subtropicales del mundo alcanzando actualmente áreas rurales que previamente no habían sido afectadas (Vong et al., 2010, p. 1-10; Murray et al., 2013, p. 305). En las Américas, existe un caso particular, el dengue epidémico y la fiebre amarilla epidémica llegaron a ser controladas en la mayoría de los países de la región, gracias al programa de erradicación de *Ae. aegypti* durante los 50's y 60's (Gubler, 2011, p. 3-11). Sin embargo, dicho programa fue parado en 1968 basándose en la idea de que erradicar este vector era una pérdida de tiempo y dinero a menos que se lograra una erradicación global. Este evento generó el inicio de la reinfestación por *Ae. aegypti* en el continente a inicios de los 70's, dando paso a la introducción de otros genotipos los cuatro serotipos, a la hiperendemicidad y a epidemias de dengue grave (Gubler, 1989, p. 577-578). En la actualidad, el dengue evidencia una amplia distribución geográfica, no solo en las Américas, sino también en el resto del mundo.

Existen diversos factores que contribuyen a la expansión de la enfermedad y del vector. Por ejemplo, el incremento poblacional en áreas urbanas, cambio climático, almacenamiento de agua en recipientes caseros no cubiertos, los viajes y migraciones, junto con frágiles medidas de salud pública en países endémicos (Gubler, 1998, p.482; Lee et al., 2011, p. 77). Estos factores han desarrollado la hiperendemicidad tanto en el Ecuador como en zonas en donde el dengue se considera endémico. En el Ecuador, se han podido evidenciar varios ciclos epidémicos en el 70% del territorio además de la continua dispersión del vector y circulación de varios serotipos virales a la vez. Resultando en la emergencia de dengue grave debido a que mientras más

serotipos virales circulen en una zona, el riesgo de padecer la forma grave de la enfermedad incrementa. Es una enfermedad que ha desarrollado una conducta endemo-epidémica desde su aparición a finales de 1988 (MSP, 2013).

La prevención y control de la transmisión del DENV se basa en la reducción de la densidad poblacional de *Ae. aegypti* (Rodríguez, 2002, p. 191) dado que no se cuentan con terapias antivirales y una vacuna licenciada (Ibañez-Bernal y Gómez-Dantés, 1995, p. 4). Lastimosamente, los intentos de erradicación del mosquito no sólo se han visto afectados por su comportamiento inusual y la poca información existente; sino también por ciertas variables económicas, políticas, sociales y administrativas de las localidades más susceptibles de la Costa y la Amazonía (Rodríguez, 2002, p. 191). En el país, el último estudio entomológico reconocido fue realizado en la década de los 40's por el científico ecuatoriano Roberto Levi-Castillo (Levi-Castillo, 1943), lo que denota la deficiencia en el control de vectores (Clemons et al., 2010, p. 2; Somers et al., 2011, p. 1095). Además, la principal estrategia para controlar el vector ha sido la vigilancia y eliminación de las larvas con sus criaderos y controles de emergencia de *Aedes* adultos durante los brotes. A pesar de que esto ha ayudado a disminuir su población, no se ha logrado prevenir la emergencia de brotes (Chow et al., 1998, p. 583).

Dado que el 90% de las infecciones por DENV son asintomáticas, existe un subregistro de los casos de dengue que se presentan en el Ecuador, esto no permite ver el panorama real del dengue. La vigilancia y las estadísticas no reflejan todas las infecciones asintomáticas que se convierten a futuro en amplificadores de la transmisión de la enfermedad dentro del ciclo vector-humano (Méndez-Galván et al., 2014, p. 308). El sistema de vigilancia nacional es de carácter pasivo por lo que la situación del dengue en el país no se encuentra representada en los datos que se recopilan. La vigilancia pasiva únicamente abarca las notificaciones de parte de los médicos tratantes lo cual puede no coincidir con los datos reales debido a que muchos pacientes no son

tratados o no son identificados como infectados (Ministerio de Salud Pública, 2012, p.14). Al no haber una vigilancia activa que complemente la vigilancia pasiva, el sistema carece de datos que correlacionen los serotipos presentes en el vector con los reportados en pacientes infectados. Triviño (2014, p.40) concluyó que el serotipo DENV-3 ya circulaba en el país a pesar de que el MSP no lo reportara como serotipo circulante en el 2013 (OPS, 2009). Esto demuestra las fallas en el sistema de vigilancia actual y lo alarmante que es la transmisión silenciosa del dengue, pues ambos son responsables de las epidemias permanentes en las zonas endémicas (Méndez-Galván et al., 2014, p.308). Es necesario que se desarrolle una vigilancia virológica basada en el vector para complementar la vigilancia virológica realizada en pacientes infectados para generar un sistema eficiente de alerta temprana (Lee et al., 2011, p.84)

La necesidad de intensificar los planes de prevención y control se ha tornado urgente debido a la alta incidencia de dengue que se ha podido evidenciar en las Américas junto con la circulación de los 4 serotipos y la gran abundancia del vector. Por lo tanto, las estrategias que existen actualmente para prevenir y controlar el dengue deberán ser reconsideradas para adoptar una perspectiva renovada en la gestión de los programas de alerta temprana (OMS, 2009).

1.3. Justificación del Problema

El estudio de la interacción virus-hospedero y vector en un ecosistema definido permite tener un conocimiento holístico del problema. Por lo que las medidas de control del dengue podrán ser más efectivas trabajando desde diferentes aristas (Guzmán et al., 2006, p.209-210). Méndez-Galván et al. (2014, p.308) han demostrado que la detección de los diferentes serotipos de DENV en mosquitos *Ae. Aegypti*, en zonas endémicas, es crítico para los sistemas de vigilancia. Akbar et al. (2008) demostraron que la detección del DENV en mosquitos adultos utilizando la reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR) fue exitosa en la predicción de un brote epidémico en Bandung, Indonesia. Esta información es valiosa para predecir el

riesgo de contraer dengue grave, dado que mientras más serotipos virales circulan en una zona, mayor será el riesgo de padecer la forma grave de la enfermedad (MSP, 2013).

Un control eficaz de dengue debe enfocarse en la detección temprana de la infección con el DENV en mosquitos previo a la introducción de estos en la población humana (Hartanti et al., 2010, p.69). La vigilancia entomológica es una herramienta apropiada para la prevención y control de los brotes de dengue hasta que una vacuna este disponible al público. La Organización Mundial de la Salud (OMS) asegura que la prevención y reducción de la transmisión del DENV depende por completo del control del mosquito o en irrumpir el contacto que existe entre humano y vector (Basker et al., 2013, p.152). La vigilancia virológica basada en el aislamiento e identificación del virus en pacientes infectados provee importante información acerca de cambios que ocurren en la prevalencia de los serotipos del virus. Un monitoreo de los serotipos en los vectores durante periodos inter e intra-epidémicos complementaria el sistema de vigilancia (Chow et al., 1998, p.584). El estudio del DENV basado en el vector es importante para realizar la identificación de serotipos circulantes en una zona determinada ya que el vector es el único encargado de expandir y transmitir la enfermedad. El DENV puede ser detectado en mosquitos infectados hasta 6 semanas antes de que el primer caso en humanos ocurra lo que resulta muy valioso durante una epidemia y puede incrementar la sensibilidad del sistema de vigilancia (Méndez-Galván et al., 2014, p. 308).

La vigilancia del DENV en hembras *Ae. aegypti* es de potencial interés para la detección temprana de brotes de dengue debido a que los humanos con infecciones de DENV son comúnmente asintomáticos. Métodos mejorados para la detección del ARN viral o antígenos en mosquitos proveerán nuevas oportunidades para realizar una vigilancia del dengue basada en el vector (Eisen et al., 2014, p.886). Durante una epidemia estudios basados en el vector pueden identificar áreas de mayor transmisión y permitir que las autoridades

tomen medidas en lugares donde la población está en mayor riesgo. Una vigilancia virológica basada en el vector no sólo podría predecir los brotes de dengue sino también detectar el virus que circula silenciosamente (Méndez-Galván et al., 2014, p.308).

En el Ecuador es necesario llevar a cabo estudios de vigilancia virológica y entomológica para entender mejor la dinámica del vector antes de que ocurra un brote. Un sistema de alerta temprana respondería de manera más eficaz ante el apareamiento de nuevos casos de dengue. Es por ello que éste estudio busca identificar los serotipos circulantes en mosquitos *Ae. aegypti* en Nueva Loja y Esmeraldas, dos áreas endémicas de la parte norte del Ecuador, para establecer la prevalencia de infección del vector y compararla con los hallazgos reportados por el sistema de vigilancia nacional (INSPI, 2016).

1.4. Objetivos

1.4.1. Objetivo General

- Tipificar los serotipos del virus del dengue presentes en mosquitos *Ae. aegypti* en las localidades de Nueva Loja y Esmeraldas.

1.4.2. Objetivos Específicos

- Identificar mediante técnicas moleculares los serotipos del virus dengue circulantes a partir de los vectores colectados en las zonas de estudio.
- Comparar las frecuencias de los serotipos de dengue reportados por el MSP en muestras de suero con los serotipos identificados en hembras *Ae. aegypti*.

2. CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO

2.1. Virus Dengue

El DENV es miembro de la familia Flaviviridae, del género *Flavivirus*. Existen 4 serotipos del virus del dengue: DENV-1, DENV-2, DENV-3 y DENV-4. Los cuatro serotipos son similares, comparten el 65% de su genoma, a pesar de su similitud existen variaciones genéticas dentro de cada serotipo originando genotipos filogenéticamente diferenciables (tabla 1). La clasificación de los cuatro serotipos inicialmente se basó en sus propiedades antigénicas y recientemente en la similitud de sus secuencias nucleotídicas (Quintero et al., 2010, p.147). Todos los cambios nucleotídicos y aminoacídicos que los serotipos tienen, representa un alto grado de variabilidad que ocurre por inexistente actividad correctora de la RNA polimerasa. Esto ha contribuido a la diferenciación en el crecimiento, transmisión y virulencia del virus. En los últimos años el número de genotipos identificados de DENV ha incrementado lo que le ha facilitado al virus su adaptación (Laredo-Tiacareño et al., 2012, p. 31-32).

Se caracteriza por ser un virus con una cápside de forma icosaédrica con un diámetro de 50 nm aproximadamente cubierta por una envoltura lipídica sobre la cual se insertan las proteínas de membrana y de envoltura (Velandia y Castellanos, 2011, p.34).

Tabla 1. Distribución mundial de los genotipos que componen los cuatro serotipos del DENV.

Serotipo	Genotipo	Origen geográfico
DENV-1	I	Sudeste Asiático, China, Este de África
	II	Tailandia
	III	Cepas selváticas aisladas en Malasia
	IV	Islas del oeste del Pacífico y Australia
	V	América, Oeste de África y algunas Asiáticas
DENV-2	Americano	América Latina, Caribe, India e Islas del Pacífico
	Asiático 1	Malasia y Tailandia
	Asiático 2	Vietnam, China, Taiwán, Sri Lanka y Filipinas
	Americano/Asiático	Tailandia, Vietnam y América
	Cosmopolitan	Amplia distribución
DENV-3	I	Indonesia, Malasia, Filipinas e Islas del Pacífico
	II	Tailandia, Vietnam, Bangladesh
	III	Sri Lanka, África, India, Samoa
	IV	Puerto Rico, América Central, América Latina, Tahití
DENV-4	I	Tailandia, Sri Lanka, Filipinas, Japón
	II	Indonesia, Malasia, Tahití, Caribe, América
	III	Tailandia
	IV	Selváticas

Adaptado de Quintero et al., 2010, p.150.

El ciclo viral del DENV está constituido de tres etapas: entrada, fusión y descapsidación de la partícula viral. Una vez que la nucleocápside está libre en el citoplasma empieza la traducción y replicación del ARN viral. Después de obtener las partículas virales estas pasan por un proceso de ensamblaje gracias a la formación de cápsides en el retículo endoplasmático. Posteriormente, se producen dos procesos de maduración y finalmente las partículas son liberadas. Este virus está conformado por una hebra de ARN de sentido positivo el cual contiene un solo marco de lectura abierto que codifica para 10 proteínas: 3 proteínas estructurales y 7 proteínas no estructurales que en conjunto participan en el ensamblaje y replicación del virus (figura 1) (Ángel,

2006, p.40).

Las proteínas estructurales están compuestas por la proteína C, el componente básico de la nucleocápside, considerada como el primer polipéptido sintetizado por el virus, es rica en residuos de lisina y arginina los que le dan un carácter básico suficiente para interactuar con el ARN viral y formar la nucleocápside como componente estructural. La proteína E se une a receptores celulares del hospedador y facilita la fusión entre las membranas virales y celulares durante el ingreso de los virus a las células (Acosta y Gómez, 2005, p.116-120). Por último está la proteína M, considerada como una proteína de membrana extracelular y de virus en estadio maduro (Wahala y Silva, 2011, p.2375-2379).

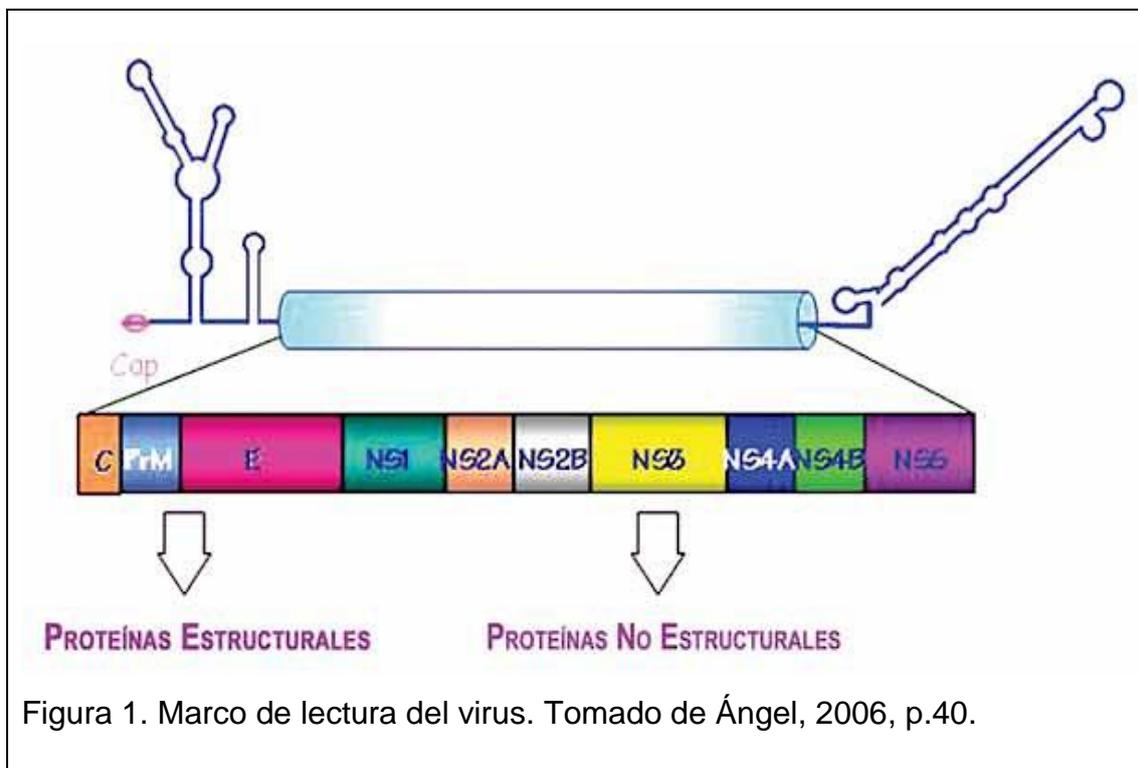


Figura 1. Marco de lectura del virus. Tomado de Ángel, 2006, p.40.

Las proteínas no estructurales que se encuentran codificadas como: NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b y NS5; siendo la más estudiada la NS1. Esta proteína forma dímeros o hexámeros asociados a acumulaciones lipídicas de la membrana plasmática, y se puede hallar soluble en el citoplasma y en el espacio extracelular (Velandia y Castellanos, 2011, p.36). Poco se conoce de

las funciones de las proteínas NS2a, NS2b, NS4a y NS4b en el ciclo de vida de los flavivirus (Acosta y Gómez, 2005, p.119).

2.2. Vector

El DENV es transmitido por el vector *Aedes* principalmente por *Ae. aegypti*. Se considera la especie mejor caracterizada (tabla 2) (Nene et al., 2007, p.1718). Es una especie tropical y subtropical con una alta distribución a nivel mundial especialmente entre las latitudes 35°N y 35°S. También se lo ha encontrado en áreas del norte durante los meses más calientes, pero no logran sobrevivir a los inviernos. Este vector no se suele encontrar por arriba de los 1.000 msnm sin embargo, los huevos son resistentes a bajas temperaturas por lo que ha sido difícil su erradicación (OMS, 2009).

Tabla 2. Clasificación taxonómica del vector del DENV.

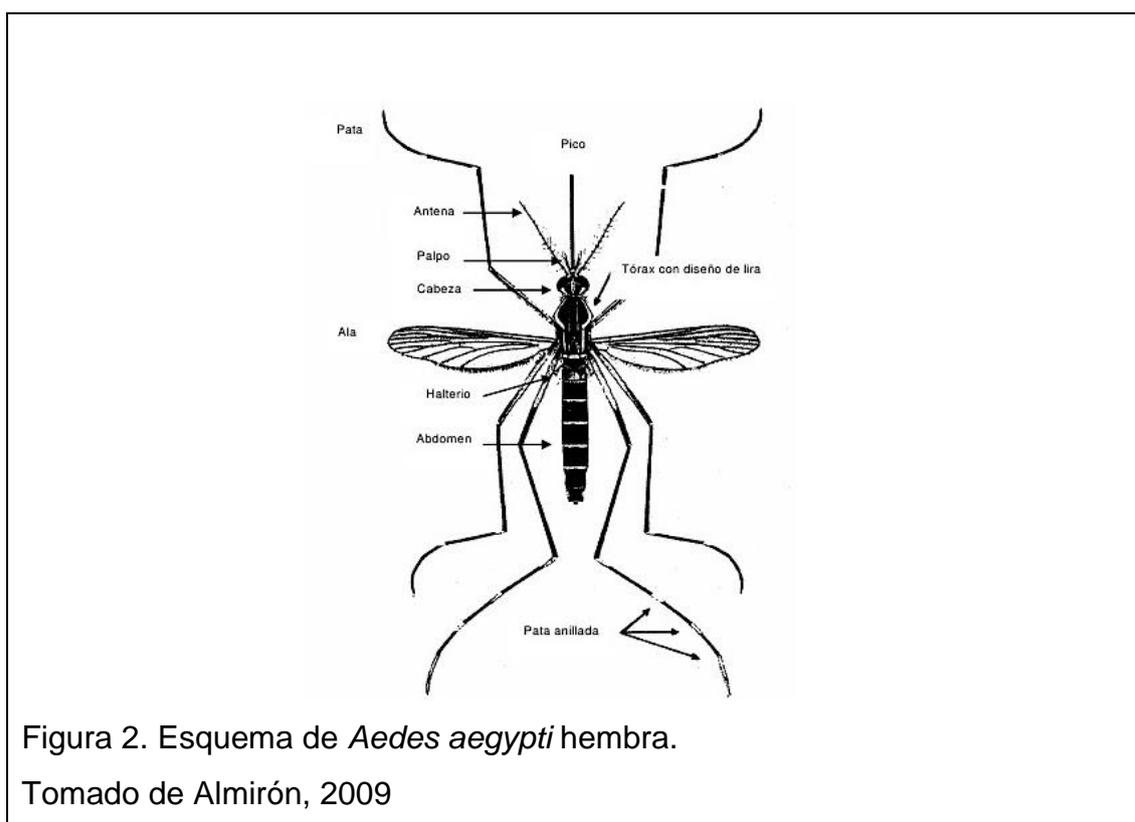
Reino	Animal
Filo	Arthropoda
Clase	Insecta
Orden	Diptera
Familia	<i>Culicidae</i>
Subfamilia	Culicinae
Género	Aedes
Especie	<i>Aedes aegypti</i>

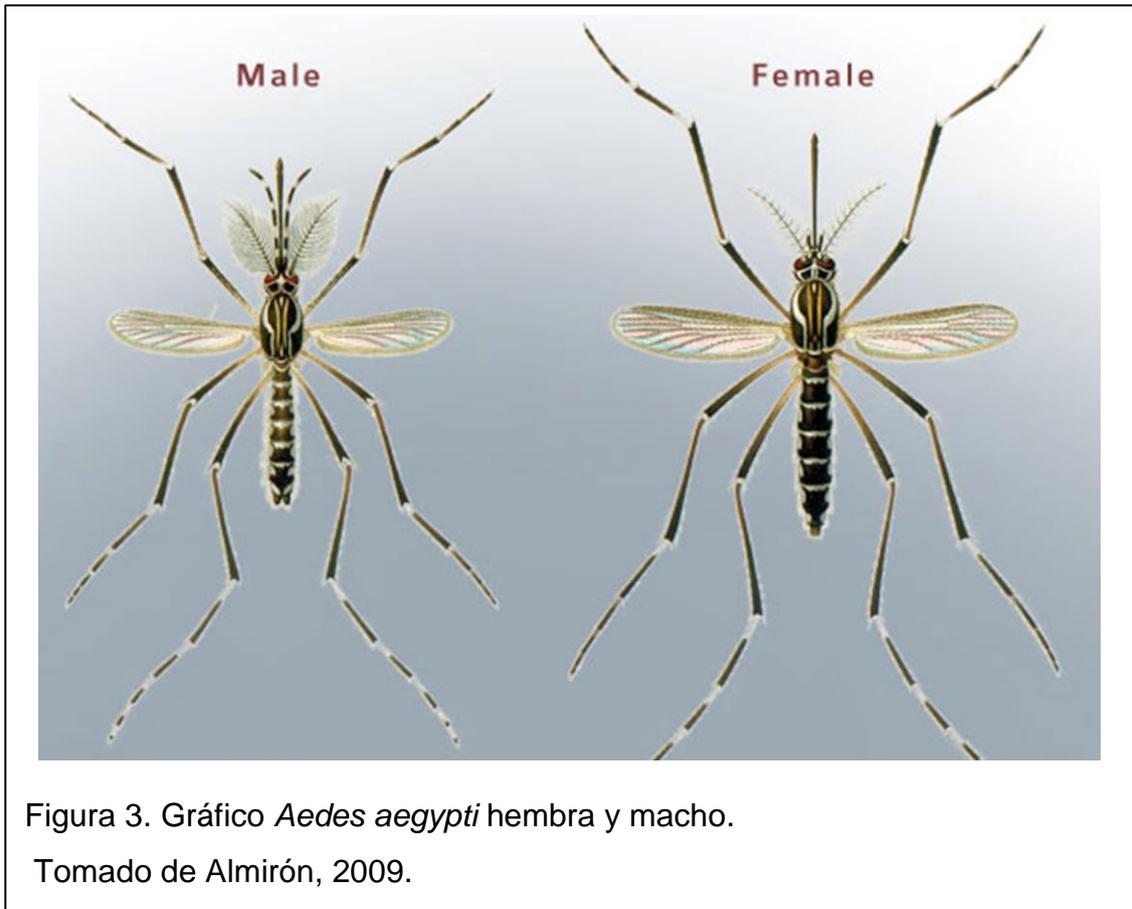
Adaptado de Centro Nacional de Programas Preventivos y Control de Enfermedades (CENAPRECE), 2014.

Los brotes de dengue también han sido ocasionados por otras especies de *Aedes* especialmente por *Aedes albopictus* cuya ubicación original estaba en el sudeste asiático pero se ha propagado, en los últimos años, de Asia a África, las Américas y Europa con la notable ayuda del comercio internacional (OMS,

2009). Esta especie es más tolerante a las temperaturas bajas por lo que se convierte en un vector más difícil de controlar una vez que empieza a radicarse (Salvatella, 1996, p.30).

Basado en su estructura, el vector *Ae. aegypti* es fácil de reconocer. Son mosquitos negros con escamas blanco-plateadas en las articulaciones y el tórax en el cual también posee un trazado en forma de lira. Miden aproximadamente 5 mm de largo y son dípteros, es decir, el primer par de alas es el funcional y el segundo par le sirven para el equilibrio (Almirón, 2009, p.1-2). Las hembras poseen antenas con pelos escasos y sus palpos son de menor tamaño que la proboscis. Los machos tienen antenas plumosas y abundantes y sus palpos son del mismo tamaño que la proboscis (figura 2) (CENAPRECE, 2014).





2.2.1. Comportamiento

La fase adulta en la vida del insecto está especializada en la distribución, alimentación y reproducción. Las hembras *Ae. aegypti* pueden volar desde 50 hasta 100 metros en busca de una pareja, alimento o sitios de oviposición (Honório et al., 2003, p.191). Sólo en el caso de no encontrar las condiciones adecuadas para su supervivencia pueden volar una distancia de 3 km (Montero, 2009, p.1). A menudo se quedan en la misma casa o sitio de emergen, siempre que tengan a su disposición fuentes de alimentación y sitios de reposo (OMS, 2012).

La alimentación de esta especie, tanto para hembras como machos, se basa en la ingesta de líquidos azucarados succionados de flores y frutos. Sin embargo, la hembra es considerada hematófaga debido a que necesita ingerir sangre para completar la ovogénesis (Conde, 2003, p.48). La ingesta de

sangre ocurre durante horas diurnas e inicia una vez que la hembra necesita aparearse. El sonido que emite la hembra al volar atrae al macho para iniciar el apareamiento. Una vez que la hembra ha sido fecundada no aceptará otra inseminación durante su vida debido a que la cantidad de esperma despositado es suficiente para fecundar todos los huevos que producirá (CENAPARECE, 2014).

Las hembras son hematófagas y desarrollan su ciclo biológico donde habita el hombre lo que las hace antropofílicas y antropofágicas. (Montero, 2009, p.3). El período que pasa entre la ingesta de sangre, maduración y colocación de los huevos se conoce como ciclo gonadotrófico. La cantidad de sangre ingerida por cada toma es de 2,5 a 3 mg. Las proteínas presentes en la sangre son esenciales para la maduración de los huevos por lo que puede ingerir sangre de más de un individuo. La digestión total se realiza en aproximadamente 72 horas en lugares de poca luz y protegidos. Puede vivir alrededor de 30 días donde podría realizar hasta 10 ciclos gonadotróficos (Terazón et al., 2012).

Las hembras distribuyen sus huevos entre los sitios con las mejores condiciones para los mismos (Honório et al., 2003, p.191). Los cuerpos de agua donde se depositan los huevos e inicia la fase acuática del *Ae. aegypti* se los denomina criaderos. La mayoría son producidos por el hombre y su tamaño puede variar desde la tapa de una botella hasta algo tan grande como una cisterna. También se pueden formar en encharcamientos, formaciones huecas en árboles y plantas. Existe una inclinación del mosquito a ciertos tipos de recipientes dependiendo de la oxigenación que estos tengan. Además la temperatura, humedad, disponibilidad de materia orgánica, capacidad y estabilidad del agua junto con el color, olor, entre otros deben ser óptimos (CENAPRECE, 2014).

El DENV entra al organismo del vector después de haber picado un hospedero virémico. Este viaja a las células epiteliales del intestino y se replica. La infección avanza y afecta principalmente al sistema nervioso enlenteciendo el

proceso de alimentación produciendo el aumento del tiempo de succión sanguínea. Esto da paso a que puedan ocurrir interrupciones causadas por el humano que le llevan a tener alimentaciones en varios individuos aumentando la probabilidad de transmisión del DENV (Hernández y García, 2000, p.3). Dentro del organismo del vector el virus también infecta órganos como los túbulos de Malpighi y los ovarios por lo que se ha considerado la existencia de la transmisión vertical del virus (Cahyo et al., 2012, p.275).

El virus se puede mantener en la naturaleza mediante la transmisión trans-ovárica en mosquitos ya que se puede replicar en tejidos potencialmente vulnerables de los ovarios y embriones (Hartanti et al., 2010, p.66). Mourya et al. (1994) demostró que los mosquitos infectados verticalmente pueden transmitir de forma oral el DENV. Los huevos de hembras infectadas que eclosionan después de varias semanas de incubación a temperatura ambiente incrementan en la tasa de transmisión vertical ya que a esta temperatura el virus puede multiplicar el número de copias en los embriones quiescentes (Hartanti et al., 2010, p.68). Los adultos que emerjan serán capaces de iniciar el ciclo humano-mosquito-humano (Joshi et al., 2002, p.158).

2.2.2. Capacidad y competencia vectorial

La habilidad que tiene un vector para transmitir un patógeno bajo condiciones dadas de espacio y tiempo es conocida como capacidad vectorial. La transmisión efectiva del DENV está asociada a las diversas características que le van a permitir al vector transmitir la enfermedad. Esta capacidad comprende componentes extrínsecos entre los que están la longevidad, la abundancia del vector, entre otros; e intrínsecos relacionados con la genética del vector lo cual influye a que este sea más susceptible a la enfermedad, a que el patógeno se desarrolle con más facilidad y a que su transmisión sea eficiente (Quintero et al., 2010, p.148-152).

La competencia vectorial es la habilidad intrínseca que tiene un vector para transmitir con éxito una enfermedad causada por un patógeno. Esta se encuentra determinada esencialmente por factores genéticos que contribuyen a que el vector pueda transmitir tal agente infeccioso. Cuantitativamente se la conoce como el número de picaduras que un organismo va a recibir en un determinado tiempo, en pocas palabras es el potencial que un vector tiene para transformarse en infeccioso y después poder transmitir la enfermedad. La competencia vectorial está limitada a la interacción vector-patógeno por lo que sólo va a depender de factores intrínsecos del vector y los que tengan una relación con el patógeno. Estos son los receptores virales en órganos blanco del vector, las barreras naturales a la infección (físicas del vector), las barreras inmunológicas a la infección, el tamaño corporal del vector, la competencia entre especies por el hábitat, los diferentes serotipos, genotipos y cepas virales. Una vez que un vector es considerado capaz y competente puede transmitir eficientemente el patógeno tanto horizontal como verticalmente (Quintero et al., 2010, p.148-152).

2.2.3. Transmisión del Virus del Dengue

El DENV puede ser transmitido por el ciclo selvático y el ciclo urbano, los cuales se caracterizan por:

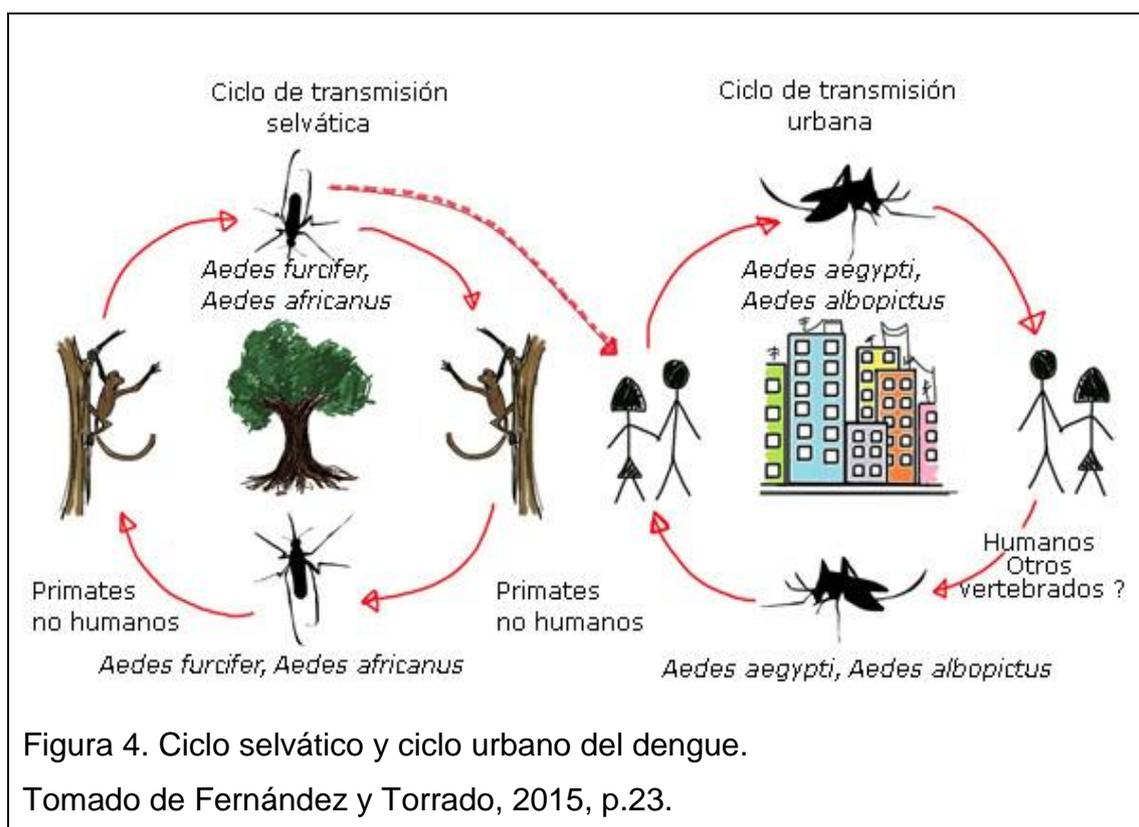
Ciclo selvático

El ciclo de transmisión selvático o enzoótico se da entre especies de *Aedes sp.* que difieren de *Ae. aegypti* (*Ae. niveus*, *Ae. furcifer*, *Ae. taylori* y *Ae. luteocephalus*) las cuales viven en las copas de los árboles, y primates no humanos (Figura 3). Estos animales se encuentran en los bosques lluviosos de Asia y África. Los primates pueden ser infectados y desarrollar títulos virémicos pero no presentan síntomas clínicos por lo que solo serían reservorios del virus (Rivas, 2005, p.22). Debido a la poca información que existe del ciclo enzoótico del dengue se considera como una enfermedad preferentemente transmitida

dentro de un ciclo urbano (Puentes, 2011, p.10).

Ciclo urbano

El ciclo urbano o epizootico se presenta en un patrón vector-hombre-vector. El ser humano es el principal hospedero amplificador del virus (figura 4). Los vectores se alimentan de sangre en la que está circulando el DENV y la fuente está en estado de viremia. Una vez que el mosquito infecta por completo al vector este puede transmitir el agente produciendo un gran espectro clínico (Puentes, 2011, p.11). El *Ae. aegypti* es uno de los vectores con más eficiencia para transportar los arbovirus debido a su antropofilia. Por lo general pica varias veces antes de finalizar la ovogénesis y permanece cerca de los seres humanos (OMS, 2009).



Periodo de incubación

Existen dos tipos de periodos para la incubación del DENV: el extrínseco y el intrínseco. El período de incubación extrínseco que dura entre 8 y 12 días empieza cuando el virus entra en el vector e infecta el intestino medio para después propagarse por todo el sistema (tejido nervioso, hematocitos, grasa corporal y glándulas salivares) (Rivas, 2005, p.24). Este período está influenciado por las condiciones del medio ambiente especialmente la temperatura. Luego de este período de incubación extrínseco, el virus puede ser transmitido a otros seres humanos mediante una picadura. El mosquito va a permanecer como un individuo infeccioso durante el resto de su vida (OMS, 2009).

Después de que el humano es picado por un mosquito infectado el virus entra en un periodo de incubación intrínseco de 3 a 14 días, durante este tiempo el hospedero no presenta síntomas clínicos. Posteriormente, el hombre entra en un periodo febril (2-10 días) en donde el virus circula por la sangre periférica. Durante el estado de viremia si un mosquito pica al hospedero este corre el riesgo de infectarse (Rivas, 2005, p.24).

2.3. Inmunopatogénesis y manifestaciones clínicas

El dengue y dengue grave es causado por cualquiera de los 4 serotipos del virus los cuales poseen una divergencia de alrededor del 30% (Tuiskunen y Lundkvist, 2013, p.1-2). Antígenos contra el DENV han sido detectados en macrófagos y monocitos de órganos linfoides, hígado y pulmones; en células dendríticas, linfocitos CD4+ y CD8+ células mononucleares aisladas de sangre periférica de pacientes infectados. Hasta el momento no se han identificado específicamente los receptores del DENV presentes en las células blanco pero se sabe que la participación de la proteína E del virus es indispensable (Mcbride y Bielefeldt-Ohmann, 2000, p.1042).

Estudios previos describen una proteína de superficie en los monocitos del humano responsables de unirse con el DENV en ausencia de anticuerpos específicos del virus (FcR) (Daughaday et al., 1981). Mientras que Chen et al. (1996) no pudo detectar unión del virus a los monocitos humanos por otra vía que no sea la de FcR. Otros estudios que describieron moléculas de unión en hepatocitos, células C6/36 y Vero implicaron tanto a las glicoproteínas como a glicosaminoglicanos en el proceso de unión e ingreso a la célula al igual que proteínas no FcR. Concluyeron que las moléculas blanco pueden variar según el tipo celular (Mcbride y Bielefeldt-Ohmann, 2000, p.1042).

Una vez que el virus se une a la superficie celular empieza la endocitosis. Después de que el virus entra al endosoma y el pH baja la proteína de la envoltura viral cambia de un dímero a un trímero permitiendo la fusión de la envoltura con la membrana endosomal y la nucleocápside es liberada en el citoplasma. Inmediatamente inicia la replicación del genoma viral. El genoma viral replicado será envuelto en nuevas nucleocápsides obteniéndose una acumulación de viriones dentro de vesículas internas del citoplasma. Finalmente todas las nuevas partículas serán liberadas para dar paso a la infección del organismo iniciando la sintomatología (Westaway et al., 1997, p.6650-6651).

El dengue es una enfermedad que puede presentarse asintómicamente o sintómicamente o simplemente progresa a un estado severo. Dentro de los muchos síntomas que esta enfermedad puede presentar está la cefalea, dolor retro-ocular, osteomiasias, náuseas, entre otros. En algunas ocasiones también presenta síntomas de diarrea y de carácter respiratorio. Esto dificulta la diferenciación clínica del dengue de otras entidades que se hacen presentes de forma temprana como un síndrome febril agudo inespecífico, tales como, la influenza, rubéola, gastroenteritis, fiebre tifoidea, leptospirosis, entre otras (Martínez-Vega et al., 2006, p.1157).

En los años 70 la OMS presentó una clasificación para los casos de dengue para facilitar el diagnóstico así como el tratamiento de los pacientes y el seguimiento de la enfermedad. Se dio paso a definiciones como: fiebre del dengue (FD) o dengue clásico, dengue hemorrágico (FHD) y síndrome de choque por dengue (SCD). Lamentablemente esta definición no tuvo éxito y fue cuestionada en la mayoría de los países donde hay casos de dengue y dengue hemorrágico ya que los síntomas que presentaban los pacientes y los resultados de laboratorio no coincidían con los que la OMS había definido. Hoy en día esta enfermedad está clasificada según el nivel de gravedad: dengue con o sin presencia de señales de alarma y dengue grave (figura 5) (Bacallao y Quintana, sf, p.7).

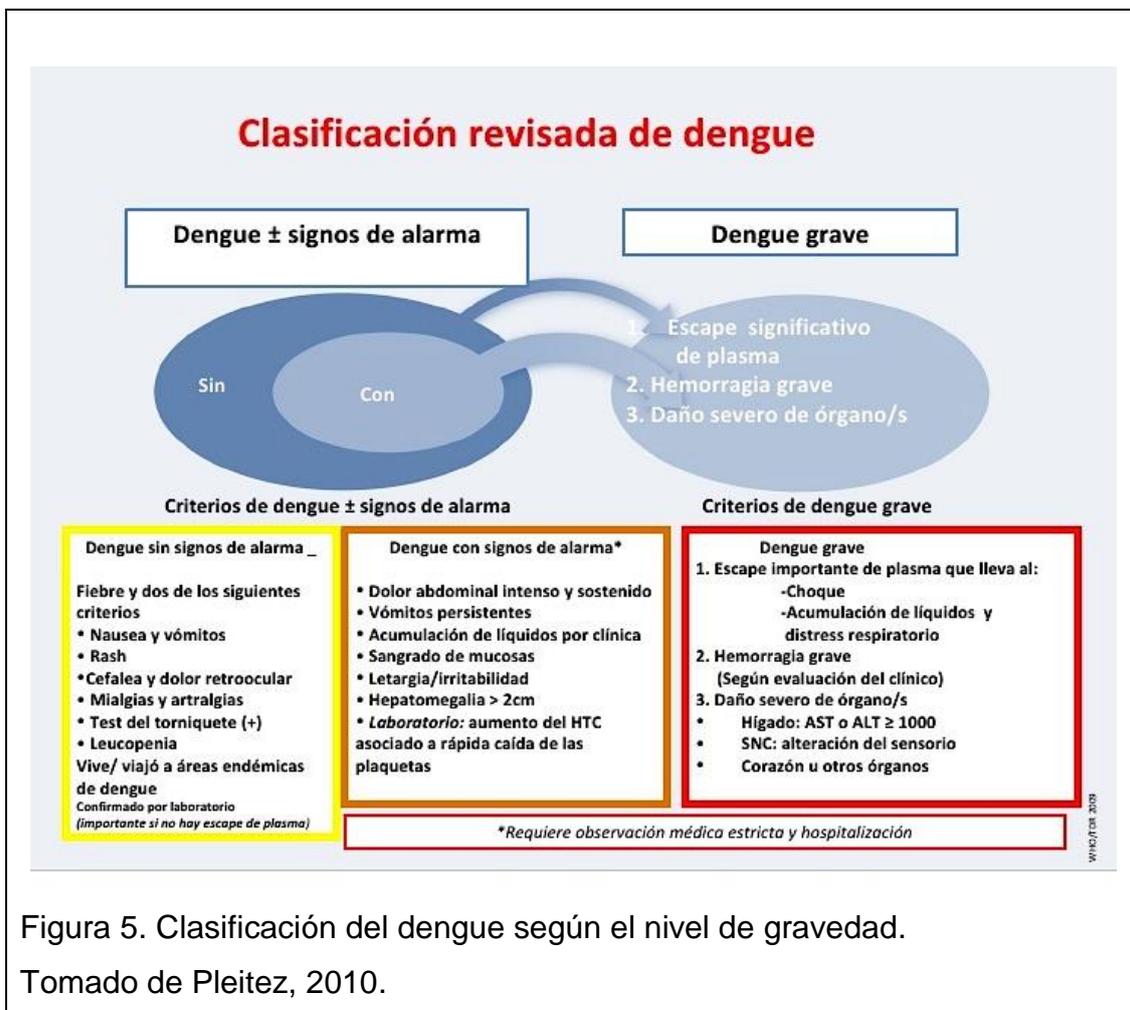


Figura 5. Clasificación del dengue según el nivel de gravedad.

Tomado de Pleitez, 2010.

La infección con este virus provee inmunidad contra el serotipo por el cual el hospedador fue infectado pero no en contra de los serotipos restantes. Las personas expuestas a una infección por DENV mantienen anticuerpos específicos por décadas (Wahala y Silva, 2011, p.2379-2380). En estudios previos realizados por Sabin (1952, p.30-50) para determinar la durabilidad de la respuesta inmune después de una infección por DENV demostraron que la protección era permanente para una reinfección en sujetos con el serotipo homólogo pero para los serotipos heterólogos era pasajera (Wahala y Silva, 2011, p.2379). Se ha documentado el hecho de que individuos expuestos a una segunda infección son susceptibles a contraer la forma grave de la enfermedad.

Existen dos explicaciones para la fisiopatología del virus:

Inmunopotenciación mediada por anticuerpos

Esta teoría trata de una infección secundaria en personas que fueron inmunizadas previamente por un serotipo heterólogo que podría incrementar en lugar de disminuir debido a los anticuerpos preexistentes. Cuando una persona se infecta por primera vez se generan anticuerpos neutralizantes de la infección pero también se forman anticuerpos no neutralizantes que suelen reaccionar con los serotipos heterólogos. Debido a este fenómeno en una segunda infección la entrada del virus será facilitada por los receptores Fc- γ . Los receptores Fc- γ que se encuentran presentes en monocitos y macrófagos tienen tres funciones: “regulación de la respuesta inmune, ingestión de complejos inmunes y funciones del receptor neonatal para IgG” (Acosta y Gómez, 2005, p.28). Al verse facilitada la entrada del DENV un mayor número de células va a ser infectado, aumentando la replicación del virus junto con la liberación de mediadores que van a aumentar la permeabilidad vascular (Bacallao y Quintana, sf, p.4).

Hipótesis complementaria

Plantea que cuando el virus entra en la célula blanco mediado por los receptores Fc- γ se inicia una inhibición de la respuesta inmune mediada por la secreción de IL-6 e IL-10 junto con la inhibición transcripcional de la producción de IL-12, TNF- α e IFN- γ creando un ambiente ideal para la replicación viral (Bacallao y Quintana, sf, p. 4).

Estas dos teorías se utilizaron de base para plantear que el dengue con fiebre hemorrágica es más común en las segundas infecciones. Cuando un individuo se infecta con el virus hay una alta población de linfocitos T lo que genera un daño tisular con lisis celular e inflamación en el paciente. Cuando sucede una segunda infección con un serotipo heterólogo se activan clones CD8+ hiperreactivos que producen una alta concentración de citoquinas pro y antiinflamatorias en conjunto con una activación extendida de células CD8+ y otros factores que afectan la permeabilidad de los vasos. Además, las células T pierden su capacidad citolítica por lo cual se podría observar un retraso en la eliminación del virus (Bacallao y Quintana, sf, p.4).

2.4. Epidemiología

El dengue es una de las enfermedades virales transmitidas por vectores que más morbilidad y mortalidad genera a nivel mundial (OMS, 2009). De acuerdo con la OMS, dos quintas partes de la población mundial vive en un constante riesgo de infectarse con DENV y más de 100 países han sido afectados por brotes epidémicos de dengue o dengue grave. La OMS estima que cada año ocurren más de 50.000,000 casos de dengue de los cuales 500 000 son con hospitalización y 20.000 son defunciones. Además, el 95% de los casos han demostrado presentarse en niños. El control de la enfermedad tiene un alto costo y las epidemias generan un gran impacto negativo en el área socioeconómica de los países (Rodríguez, 2002, p.189).

Su incidencia ha aumentado en los últimos años por lo que es considerada como una de las enfermedades infecciosas emergentes y de gran riesgo para la población (Rivera y Pérez, 2010, p.150). Brotes de dengue han sido reportados en todos los continentes a excepción de la Antártida. A pesar de que el origen del dengue no se conoce con certeza varias especulaciones mencionan que el virus es originario de África y que se introdujo en otros continentes debido al vector *Ae. aegypti* (Aaskov, 2003, p.66-71).

Los primeros registros de la enfermedad son procedentes de África, Asia y Norteamérica. Y fueron provocados por brotes a bordo de embarcaciones relacionadas con personas extranjeras como colonos y viajeros (Gubler, 2006, p.3-4). Las primeras epidemias de enfermedades similares al dengue se presentaron de 1779 a 1780, cuando ocurrieron brotes en Jakarta, El Cairo y Filadelfia. Hasta la Segunda Guerra Mundial las epidemias ocurrían en casi todos los continentes cada 10-30 años. Los brotes al presentarse no tan seguidos se consideraron una enfermedad benigna y no fatal. Después de 1945 los casos de dengue se complicaron al mostrar hemorragias y shock lo cual fue documentado en el sureste de Asia. La primera epidemia con dengue grave fue reportada en las Filipinas en 1953-1954 después de eso la actividad epidémica del dengue grave se intensificó en la región (Mairuhu et al., 2004, p425-426).

Colombia se vio aquejada por una gran cantidad de brotes protagonizados por los serotipos DENV-2 y DEN-3 en el año 1970. En el año 1977 el serotipo DENV-1 fue introducido en las Américas causando brotes que se expandieron hasta las costas del resto de América (OPS, 1995). En 1981 ocurrió una epidemia bastante grave en Cuba por otro lado Venezuela padeció otras considerables en 1989 y 1990. Tanto los países de América como de Asia informan de miles de casos anualmente en este último continente el dengue grave ya es endémico. En 1994 después de la ausencia del DENV-3 por 16 años se aisló el virus en pacientes residentes en Panamá y Nicaragua (Clark, 1995, p.5-11).

En el Ecuador el dengue es endémico y se presenta en las épocas de lluvia en las provincias de la costa y la amazonía. Después de la introducción del serotipo 1 se registró el primer brote y la introducción del serotipo 2 en 1990. En 1993 el serotipo 4 fue registrado por primera vez y para el año 2000 con el registro del serotipo 3 circulaban simultáneamente los cuatro serotipos (OMS, 2012).

La Dirección Nacional de Vigilancia Epidemiológica y la Coordinación de la Estrategia de Lucha contra el Dengue del Ministerio de Salud Pública han reportado varios casos de dengue a lo largo de los años. Hasta la semana # 39 del 2013 fueron confirmados un total de 11.662 casos de dengue de ellos el 90% pertenecieron a dengue sin signos de alarma el 8.9% fueron casos de dengue con signos de alarma y 0.5% fueron casos de dengue grave. Dentro de la provincia de Esmeraldas, en el mismo año se presentaron 334 casos en total (dengue con y sin signos de alarma y dengue grave) y dentro de la provincia de Sucumbíos 643 casos en total (tabla 3) (MSP, 2013).

Tabla 3. Casos de dengue y dengue grave confirmados en las semanas epidemiológicas 1 a 39 en el Ecuador.

Provincias	Total casos de dengue	Dengue sin signos de alarma	Dengue con signos de alarma	Dengue grave	Fallecidos por dengue
Guayas	2.966	2.652	290	24	4
Manabí	2.099	1.966	128	5	1
Los Ríos	1.586	1.524	58	4	1
El Oro	1.265	1.074	185	6	1
Esmeraldas	334	296	34	4	2
Santa Elena	271	253	18	0	0
Galápagos	0	0	0	0	0
Santo Domingo	199	179	20	0	0
Carchi	1	1	0	0	0
Imbabura	34	33	1	0	0
Pichincha	143	115	21	7	0
Bolivar	263	260	3	0	0
Cotopaxi	23	23	0	0	0
Tungurahua	10	6	4	0	0
Chimborazo	13	11	1	1	0
Cañar	223	175	47	1	0
Azuay	62	45	16	1	0
Loja	37	28	9	0	0
Sucumbíos	643	539	103	1	0
Napo	164	152	12	0	0
Orellana	1.013	933	75	5	2
Pastaza	16	14	2	0	0

Adaptado de Gaceta epidemiológica No. 39, 2013.

2.5. Vigilancia del dengue

La vigilancia del dengue puede ser activa o pasiva. La vigilancia pasiva depende en su totalidad de los reportes de casos de parte de los médicos tratantes. Informes y notificaciones constantes son necesarios de parte de todas las clínicas, hospitales y centros de salud de un país. Deben ser capaces de definir las tendencias en la transmisión del DENV y mostrar cualquier aumento en su incidencia. La vigilancia activa implica una investigación proactiva de todas las posibles infecciones con dengue. El objetivo de un

sistema activo de vigilancia basado en pruebas o técnicas de laboratorio es proveer información temprana y con gran precisión sobre algunos aspectos del incremento de la actividad del dengue (tiempo, la ubicación, serotipo de virus y la gravedad de la enfermedad). Es así como la detección de casos con anticipación mejorará la capacidad y brindará mayor eficiencia a los servicios de salud pública para prevenir y controlar la expansión de la enfermedad. Se complementa con otros cinco componentes, los cuales son la vigilancia epidemiológica, serológica, entomológica, clínica y virológica (Querales, 2002).

2.5.1. Vigilancia Epidemiológica

Se basa en analizar e interpretar datos y resultados para así difundir recomendaciones que generen cambios para mejorar la salud en un lugar específico. Es un sistema que estudia de cerca el comportamiento de una enfermedad y sus fenómenos. Esto lo hacen mediante reportes y notificaciones de los hechos dando paso a mejoras y disminución de riesgos (Lossa et al., s.f).

2.5.2. Vigilancia Entomológica

Se usa para identificar variantes en la distribución de los vectores y así obtener datos de su densidad población a lo largo del tiempo esto facilita la toma de decisiones apropiadas y favorables para realizar intervenciones (Miró et al., 2008, p.3).

2.5.3. Vigilancia Clínica

Es el monitoreo de aquellas enfermedades o indicadores públicos vinculados con la salud tales como síntomas que anticipen brotes, llevadas a cabo por profesionales de la salud (OMS, 2009).

2.5.4. Vigilancia Serológica

Reside en la detección de anticuerpos específicos del DENV en el suero de pacientes infectados mediante análisis ELISA. Se considera útil para realizar una vigilancia clínica y estimar los índices de transmisión del DENV a través de investigaciones estadísticas y serológicas que se realiza poco después de que la epidemia empieza a disminuir e identifica patrones de infecciones pasadas (Rodríguez et al., 1995).

2.5.5. Vigilancia Viroológica

Se basa en la identificación del virus a partir de suero obtenido de individuos infectados mediante el aislamiento del virus, inoculación tanto en mosquitos como en cultivos celulares y el análisis mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR). Sirve para detectar los serotipos circulantes y así prevenir y predecir brotes epidémicos del dengue (Matheus et al., 2012, p.159). Dentro de esta clasificación también está la vigilancia virológica basada en el vector. La disponibilidad del monitoreo de la presencia del DENV tanto en la población del vector como en los pacientes infectados podría ser un complemento valioso de los sistemas de alerta temprana lo que daría como resultado un control mucho más efectivo del

3. CAPÍTULO III. METODOLOGÍA

3.1. Zona de Estudio

La colección de los mosquitos analizados en este estudio se realizó en Nueva Loja, provincia de Sucumbíos. A una latitud: $0^{\circ} 3' 34''$ S y longitud: $77^{\circ} 9' 2''$ W ubicada a 265 Km de la ciudad de Quito, en dirección noreste, al este del Ecuador (Ecuale, 2015).



También en Esmeraldas, provincia de Esmeraldas. A una latitud: $0^{\circ} 57' 0''$ N y longitud: $79^{\circ} 40' 0''$ W ubicada a 318 Km de la ciudad de Quito en dirección noroeste, al noroccidente del Ecuador (figura 6) (Ecuale, 2015).

3.2. Procedimientos

3.2.1. Fase de campo

3.2.1.1. Identificación de puntos estratégicos

El proyecto SATVEC es un estudio que lleva a cabo el INSPI en un tiempo estimado de 28 meses con el fin de "Obtener información biológica de *Ae. aegypti*, climatológica y socioeconómica para desplegarla con Sistemas de Información Geográfica" (INSPI, 2016). Este proyecto consiste en el muestreo de mosquitos *Aedes* (en todos sus estadíos) en 15 localidades de 13 provincias del Ecuador (tabla 4). Las colectas se realizaron en zonas urbanas y rurales de las áreas seleccionadas en base a los reportes epidemiológicos del MSP. El diseño de la metodología de muestreo es un diseño simple al azar en donde los circuitos subcircuitos y calles se escogieron mediante números aleatorios (INSPI, 2016). Las localidades en las que se realizó este trabajo fueron proporcionadas por el INSPI. Esmeraldas y Nueva Loja (así como sus circuitos y calles) forman parte de las 15 ciudades con la mayor incidencia de casos según el MSP. La colecta se realizó en todas las casas de las calles establecidas dentro de los mapas geográficos del circuito delimitado.

En Esmeraldas, la primera colecta se llevó a cabo en la semana del 04 al 08 de Agosto del 2014 durante la época seca, la segunda colecta fue en la semana del 04 al 08 de Mayo del 2015 y la tercera fue del 26 al 28 de Diciembre del 2014 estos dos últimos en época de lluvia. El muestreo en la ciudad de Nueva Loja fue en la semana del 25 al 28 de Agosto del 2014 y en la semana del 25 al 28 de Mayo del 2015, los dos durante la época de lluvia. La frecuencia de colectas se vio afectada por el escaso número de individuos vectores colectados en la primera salida lo que obligó a planificar otras visitas.

Tabla 4. Localidades a estudiar en el proyecto SATVEC.

Provincia	Localidad
Chimborazo	Cumandá
Esmeraldas	Esmeraldas, San Lorenzo
Galápagos	Puerto Ayora, Puerto Baquerizo Moreno
Guayas	Guayaquil, Alfredo Baquerizo Moreno (Juján), Daule, Milagro
Los Ríos	Babahoyo, Quevedo, Vinces
Manabí	Portoviejo, Manta, Chone
Morona Santiago	Macas
Napo	Tena
El Oro	Arenillas, Machala
Orellana	Francisco de Orellana (Coca)
Pastaza	Puyo
Sto. Domingo de los Tsáchilas	Sto. Domingo
Sucumbíos	Nueva Loja

Adaptado de INSPI, 2016.

3.2.1.2. Colecta de mosquitos adultos

La colecta se llevó a cabo durante los periodos de inactividad del mosquito, misma que va desde las 9 de la mañana hasta las 4 de la tarde. La duración de cada recolección fue de aproximadamente 20 minutos. La búsqueda intradomiciliaria se realizó en dormitorios, armarios y lugares oscuros. El muestreo peridomiciliario se lo realizó en tanques de almacenamiento de agua cercanos o dentro de los patios de las casas. Para la captura de los mosquitos se utilizó aspiradoras tipo mochila (BioQuip, USA) accionados con baterías recargables de 12 voltios.

Los mosquitos fueron sedados con acetato de etilo para ser identificados como *Aedes* y separados por sexo. La morfología característica de las antenas

permite la diferenciación entre hembras y machos. Las antenas plumosas son típicas de los machos mientras que antenas más pequeñas y menos densas a las hembras. Las hembras fueron utilizadas para la identificación molecular del DENV. Se las colocó una en cada tubo de microcentrífuga de 1,5 mL junto con 200 μ L de RNAlater (Thermo Fisher Scientific, USA) y refrigeradas a 4° C. Las muestras fueron transportadas al Laboratorio de Biología Molecular del Centro de Investigación Traslacional (CIT) de la Universidad de Las Américas (UDLA) ubicado en la ciudad de Quito.

3.2.2. Fase de laboratorio

3.2.2.1. Extracción de ARN y cuantificación

Se extrajo el ARN total de cada hembra *Ae. aegypti* usando el RNAqueous®-MicroKit (Thermo Fisher Scientific, USA). Se colocó cada hembra en un tubo de microcentrífuga de 1,5 mL junto con 100 μ L de Lysis Solution. Se macerará cada mosquito con un pistilo hasta que el tejido quede totalmente triturado. Después se colocó 50 μ L de etanol al 70% y se homogenizó en un vortex. Se centrifugó durante 30 segundos a 13000 rpm. Se colocaron 150 μ L de la muestra en tubos con microfiltro y fueron centrifugadas por 10 segundos a máxima velocidad. Se añadieron 180 μ L de Wash Solution 1 y se centrifugó por 10 segundos a máxima velocidad. Después se adicionaron 180 μ L de Wash Solution 2/3 y se centrifugó por 10 segundos a máxima velocidad, éste último paso debe ser repetido. Posteriormente se descartó el líquido del tubo recolector y se centrifugó por 1 minuto a máxima velocidad con el fin de secar el filtro. Se colocó el filtro en un nuevo tubo colector y se añadió 10 μ L de la solución de elución previamente calentada a 75 °C y se centrifugó por 30 segundos a máxima velocidad. Se repitió este paso una vez más. Se obtuvo 20 μ L de ARN en total de cada hembra de los cuales se utilizaron 5 μ L para la cuantificación y determinación de la calidad del ARN en un espectrofotómetro (BioTek, USA) y 5 μ L para su posterior análisis. Para los controles positivos se

utilizaron *Aedes* machos junto con 10 μ L de sobrenadante viral y se realizó el mismo proceso con el kit de extracción.

3.2.2.2. Amplificación

Para la ejecución de la RT-PCR se utilizó el kit One Step SuperScript III RT/Platinum Taq (Thermo Fisher Scientific, USA) y agua para PCR (Thermo Fisher Scientific, USA). Cinco cebadores fueron utilizados en el ensayo: un cebado 5' cuyo objetivo es una región del gen de la cápside conservado entre los 4 serotipos y cuatro cebadores 3' complementarios a secuencias únicas de cada serotipo. Los cebadores están posicionados de tal forma que den como resultado un producto de diferente tamaño como se muestran en la tabla 5.

Estos cebadores fueron tomados de un estudio realizado por Harris et al. (1998, p.2635) en el cual modifican el cebador DEN4 del utilizado inicialmente en un estudio desarrollado por Lanciotti et al. (1992, p.546) para evitar la formación de horquillas y mejorar el rendimiento del producto. Lanciotti et al. (1992) basó su diseño en estudios que secuenciaron el genoma viral de los 4 serotipos de DENV. (Deubel et al., 1986, p.365-377; Mason et al., 1987, p.262-267; Osatomi y Sumiyoshi, 1990, p.643-647 y Zhao et al., 1986, p.77-88)

Tabla 5. Secuencias de los cebadores utilizados para identificar los diferentes serotipos.

Serotipo	Cebador	Secuencia	Tamaño (pb)
DENV-1	D1	5'-TCA ATA TGC TGA AAC GCG CGA GAA ACC G	482
	TS1	5'-CGT CTC AGT GAT CCG GGG G	
DENV-2	D1	5'-TCA ATA TGC TGA AAC GCG CGA GAA ACC G	119
	TS2	5'-CGC CAC AAG GGC CAT GAA CAG	
DENV-3	D1	5'-TCA ATA TGC TGA AAC GCG CGA GAA ACC G	290
	TS3	5'-TAA CAT CAT CAT GAG ACA GAG C	
DENV-4	D1	5'-TCA ATA TGC TGA AAC GCG CGA GAA ACC G	389
	DEN4	5'-TGT TGT CTT AAA CAA GAG AGG TC	

Tomado de Harris et al., 1998, p.2365.

Los reactivos se homogeneizaron y se agregaron a cada tubo de PCR 5 μ L de muestra junto con la mix descrita en la tabla 6. Las muestras fueron amplificadas en un termociclador (Eppendorf, Alemania) según el programa adaptado de Triviño, 2014. (tabla 7).

Tabla 6. Volúmenes utilizados para amplificar las muestras

REACTIVO	CONCENTRACIÓN	CONCENTRACIÓN FINAL	VOLUMEN (μL)
2X Mix de reacción	2X		12.5
MgCl		1.6mM	
dNTPs		200mM	
D1	10 μM	0.16 μM	0.4
TS1	10 μM	0.16 μM	0.4
TS2	10 μM	0.16 μM	0.4
TS3	10 μM	0.16 μM	0.4
DEN4	10 μM	0.16 μM	0.4
SuperScript III RT/Platinum Taq Mix	200U/ μL	4U/ μL	0.5
Agua PCR			5
	TOTAL		25

Adaptado de Triviño, 2014, p.24.

Tabla 7. Programa utilizado en la amplificación.

PROGRAMA DE LA RT-PCR				
PROCESO		CÍCLO	TEMPERATURA ($^{\circ}\text{C}$)	TIEMPO
Transcripción inversa		1	52	30 min
Amplificación	Denaturación	35	94	2 min
	Hibridación		55	30 seg
	Extensión		68	1 min
Extensión		1	68	5 min

Adaptado de Triviño, 2014, p.24.

3.2.2.3. Análisis de la amplificación y secuenciación

Se realizó una electroforesis en gels de agarosa al 1.5% en TBE 1X (89 mM Borato Tris, 2 mM EDTA pH 8.3) y 4 μL de SYBR Safe (Thermo Fisher

Scientific, USA). Se utilizó 10 μ L del producto obtenido mediante la RT-PCR y 2 μ L de tampón de carga (Thermo Fisher Scientific, USA). Las muestras se corrieron a 85 Voltios y 400 Amperios durante 80 minutos. Se utilizó un marcador de peso molecular de 100 pb (Thermo Fisher Scientific, USA). El gel fue analizado mediante un fotodocumentador con luz UV (Labnet International, USA).

Únicamente las muestras que mostraron ser positivas para uno de los 4 serotipos se reamplificaron con una PCR convencional utilizando Platinum Taq DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific, USA) y siguiendo los pasos del inserto. Para comprobar que la amplificación se realizó correctamente se utilizó un análisis electroforético con 10 μ L del producto de la PCR convencional. Se mandaron a secuenciar 40 μ L por el método de Sanger (Macrogen, Corea) con el fin de asegurarnos que el serotipo identificado era el correcto.

3.2.2.4. Infección células C6/36

Las células C6/36 son células de larvas de *Ae. albopictus* las cuales son utilizadas para la propagación de *Flavivirus*. Se utilizaron estas células para propagar el virus del dengue y obtener controles positivos. Las células C6/36 fueron donadas por el Instituto de Microbiología de la Universidad San Francisco de Quito. Previo a su utilización las células se descongelaron, cultivaron e incubaron en frascos con tapa de ventilación (Corning Inc., USA) a 28 °C.

La infección de las células se debe realizar a partir del tercer pase una vez alcanzado el 90-95% de confluencia celular en el cultivo. Se removió el medio del frasco y se colocó 1 mL de tampón fosfato salino (PBS) (Thermo Fisher Scientific, USA) para lavar las células. Posteriormente se añadió 200 μ L del inóculo (DENV-1, DENV-2, DENV-3 o DENV-4) con 1 mL de medio Eagle modificado por Dubelcco (DMEM) sin suero fetal bovino (SFB) (Thermo Fisher Scientific, USA). Se incubó el frasco por una hora a 28 °C con agitación para

evitar que las células se deshidraten y el virus se distribuya homogéneamente. Se añadió DMEM suplementado con SFB al 2% hasta alcanzar un volumen final de 3.5 mL y se incubó los frascos a 28 °C con CO₂ al 5%. Se debe observar bajo el microscopio diariamente hasta detectar cambios citopáticos (forma alargada y multinucleada) o muerte celular (anexo A) y así identificar el momento correcto para realizar la cosecha del virus. Cada serotipo fue cosechado en un periodo diferente ya que los efectos citopáticos provocados por el virus se mostraron en diferentes días después de la infección (anexo B).

Para la cosecha del virus se transfirió el medio del frasco a un cónico de 15 mL y se centrifugó el medio junto con 0,805 mL de SFB para completar el volumen final de 3.5 mL. Se centrifugó los tubos a 4000 g por 10 min a 4 °C. Finalmente se pasó el sobrenadante a tubos de microcentrífuga de 1.5 mL previamente congelados para evitar la degradación del virus y congelarlos a -80 °C hasta su uso.

3.2.2.5. Cálculo de la muestra y análisis de datos

Para el cálculo de la muestra necesaria, con un porcentaje de confianza del 95%, se utilizó el software en línea OpenEpi (Open Source Epidemiologic Statistics for Public Health, versión 3.01), una compilación de calculadoras epidemiológicas de código abierto para generar estadísticas en temas de salud pública. Se usó una frecuencia del 6.1% tomado de un estudio previo realizado en el Ecuador (Triviño, 2014, p. 1-64). Este programa realiza el cálculo del tamaño de muestra mediante el uso de la siguiente ecuación:

$$n = [EDFF \times Np(1 - p)] / \left[(d^2 / Z_{1-\alpha/2}^2 \times (N - 1) + p \times (1 - p)) \right] \quad (\text{Ecuación 1})$$

(Dean et al., 2016)

En donde EDFF es el efecto de diseño (1), p es la frecuencia hipotética del factor del resultado en la población en este caso la prevalencia del virus en un estudio previo (6.1%). Z es el valor crítico, en este caso sería 1.96 para un nivel

de confianza del 95%. N es el número de la población, 189.504 para Esmeraldas y 91.744 para Nueva Loja y d es la precisión con que se desea estimar el parámetro (5%). $1-\alpha$ es el nivel de confianza (95%) (Dean et al., 2016), y obtuvimos los tamaños de muestra para iniciar el muestreo.

Para obtener la prevalencia y seroprevalencia del DENV en las dos localidades se usó la ecuación de prevalencia aparente.

$$PA = \frac{\text{Total de casos en una población}}{\text{Total de la población}} \times 100 \quad (\text{Ecuación 2})$$

(Jaramillo y Martínez, 2010, p.36).

4. CAPÍTULO IV. Resultados y discusión

4.1. Colección de mosquitos en el campo

Se viajó a Esmeraldas y Nueva Loja con el fin de coleccionar mosquitos *Ae. aegypti* mediante la aspiración de mochila. Se delimitó una muestra de mínimo 61 individuos para la ciudad de Esmeraldas y 46 para la ciudad de Nueva Loja (figura 7 y 8).

Tamaño de la muestra para la frecuencia en una población	
Tamaño de la población (para el factor de corrección de la población finita o fcp)(<i>N</i>):	189.504
frecuencia % hipotética del factor del resultado en la población (<i>p</i>):	6.1%+/-5
Límites de confianza como % de 100(absoluto +/-%)(<i>d</i>):	5%
Efecto de diseño (para encuestas en grupo- <i>EDFF</i>):	1
Tamaño muestral (<i>n</i>) para Varios Niveles de Confianza	
IntervaloConfianza (%)	Tamaño de la muestra
95%	61
80%	32
90%	47
97%	69
99%	85
99.9%	108
99.99%	123

Figura 7. Tamaño de la muestra para Esmeraldas.

Tomado de OpenEpi, versión 3.01.

Tamaño de la muestra para la frecuencia en una población	
Tamaño de la población (para el factor de corrección de la población finita o fcp)(<i>N</i>):	91.744
frecuencia % hipotética del factor del resultado en la población (<i>p</i>):	6.1%+/-5
Límites de confianza como % de 100(absoluto +/-%)(<i>d</i>):	5%
Efecto de diseño (para encuestas en grupo- <i>EDFF</i>):	1
Tamaño muestral (<i>n</i>) para Varios Niveles de Confianza	
IntervaloConfianza (%)	Tamaño de la muestra
95%	46
80%	27
90%	38
97%	50
99%	58
99.9%	68
99.99%	73

Figura 8. Tamaño de la muestra para Nueva Loja.

Tomado de OpenEpi, versión 3.01

Entre las dos localidades muestreadas se inspeccionaron un total de 1010 casas. Los tres muestreos que se realizaron en la ciudad de Esmeraldas se hicieron en la época de sequía y lluvia en el año 2014 y 2015, respectivamente. De las 510 (50.5%) casas visitadas, en 47 (9.2%) casas se encontró el vector y se colectó un total de 86 hembras *Ae. aegypti*. Del total de hembras recolectadas se capturaron 40 (46.5%) individuos alimentados. Los dos muestreos que se realizaron en la ciudad de Nueva Loja se hicieron en la época de lluvia en el año 2014 y 2015. De las 500 (49.5%) casas visitadas, en 33 (6.6%) casas se colectó el vector y se colectaron un total de 81 hembras *Ae. aegypti*. Del total de hembras recolectadas se capturaron 31 (38.3%) individuos alimentados. El número total de *Ae. aegypti* colectados fue de 167 individuos (tabla 10). En la mayoría de casas se encontró un individuo; sin embargo, en algunas casas se encontró hasta 9 individuos. En el anexo C y D se encuentra detallada toda la información de las muestras recolectadas. En la temporada de precipitación se encontró el mayor número de vectores ya que se capturó un total de 143 vectores de los 167 recolectados en las dos localidades (tabla 11).

Tabla 8. Vigilancia del virus dengue en hembras *Aedes aegypti* recolectadas en Nueva Loja y Esmeraldas

Localidad	No. casas examinadas	No. casas positivas para <i>Ae. Aegypti</i> hembras (%)	No. de hembras <i>Ae. aegypti</i> recolectadas	No. de hembras <i>Ae. aegypti</i> alimentadas	No. mosquitos positivos para DENV* (%)	Serotipos identificados por RT-PCR
Nueva Loja	500 (49.5%)	33 (6.6%)	81	31 (38.3%)	6 (7.4%)	DENV** 1,2,3
Esmeraldas	510 (50.5%)	47 (9.2%)	86	40 (46.5%)	10 (11.6%)	DENV 1,2
Total	1010	80 (7.9%)	167	71	16 (9.5%)	DENV 1,2,3

Nota: a)* DENV: Dengue virus

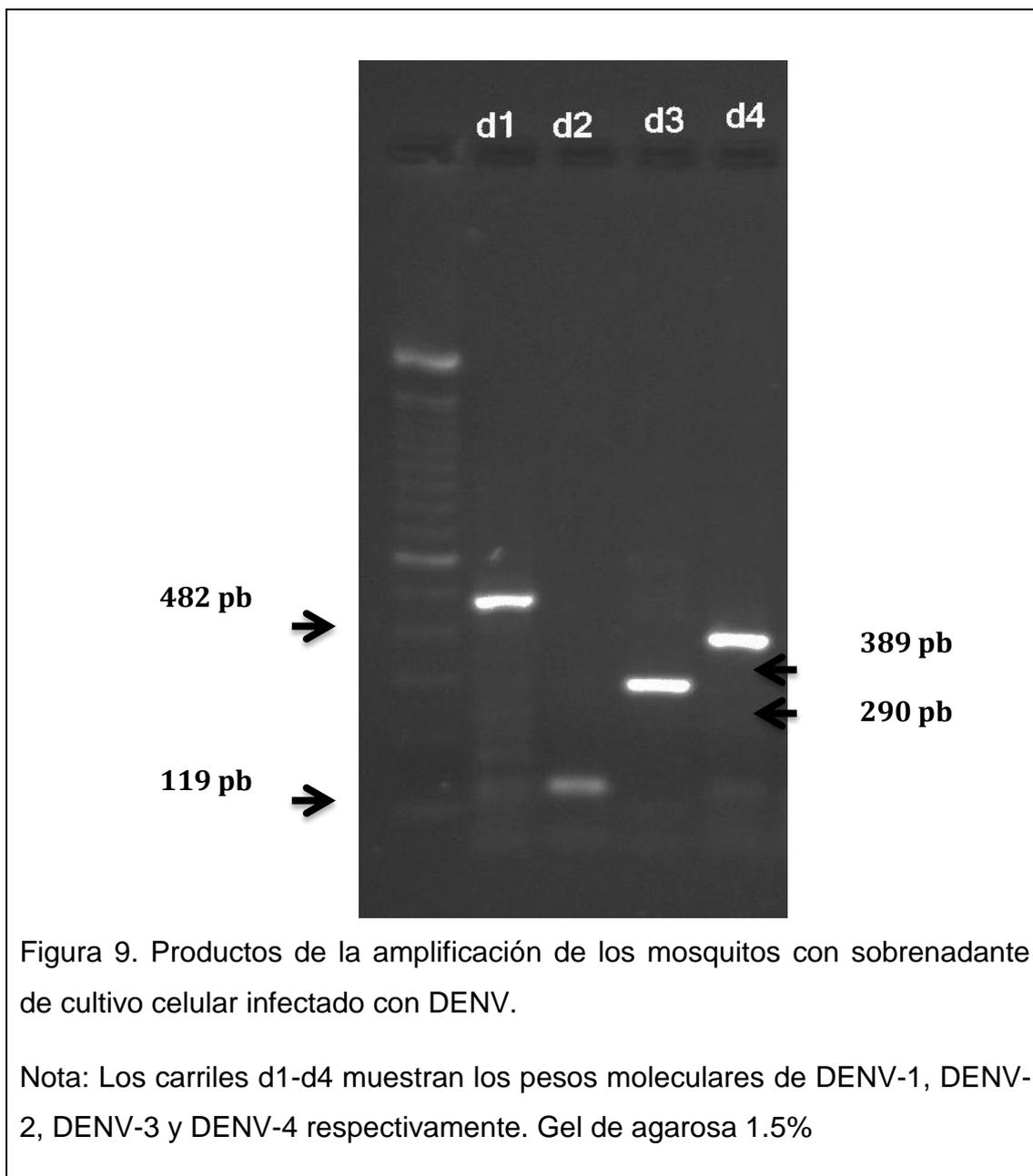
b)** Evidencia de coinfección en una muestra analizada con DENV-1 y DENV-3.

Tabla 9. Número de mosquitos *Aedes aegypti* recolectados en las diferentes temporadas del año.

	Año		2014		2015	
	Temporada	seco	lluvioso	seco	lluvioso	
Localidad	Nueva Loja	0	30	0	51	
	Esmeraldas	24	10	0	52	

4.2. Tipificación de los serotipos del DENV

Para la tipificación de los serotipos del DENV se utilizó el sobrenadante del cultivo celular infectado. En la figura 9 se puede observar los diferentes productos amplificados de individuos infectados que se obtuvieron de cada serotipo. De las muestras analizadas, 10 (11.6%) fueron positivas para DENV en Esmeraldas y 6 (7.41%) en Nueva Loja (tabla 10). Además, 7 de las 16 muestras positivas eran hembras alimentadas y el 85.7% fueron recolectadas en temporada de precipitaciones.



En la ciudad de Nueva Loja se identificaron seis vectores infectados con el serotipo DENV-1, cuatro vectores con el serotipo DENV-2 y un vector con una co-infección por los serotipos DENV-1 y DENV-3. Mientras que la ciudad de Esmeraldas se pudieron evidenciar dos vectores infectados con el serotipo DENV-1, un vector infectado con el serotipo DENV-2 y dos vectores infectados con el serotipo DENV-3 (Figura 10). Del total de ensayos positivos, el 50% pertenecen al serotipo DENV-1, 31.25% al serotipo DENV-2 y el 12.5% al serotipo DENV-3. Las muestras co-infectadas son el 6.25%.

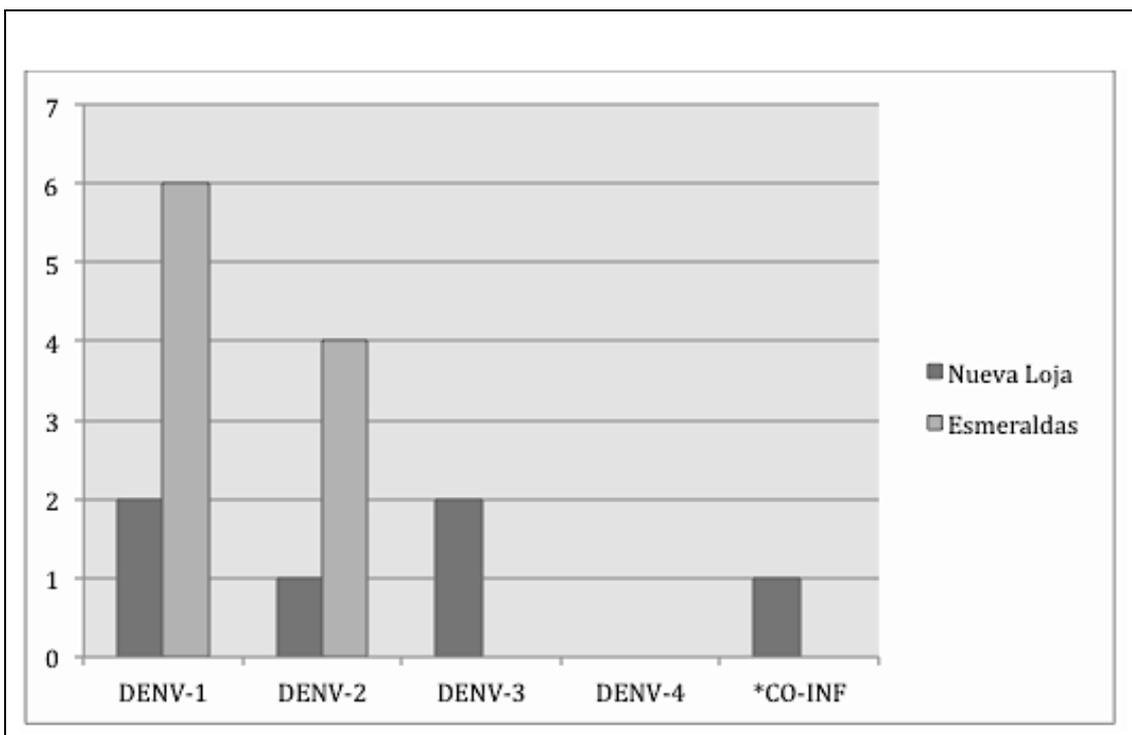


Figura 10. Número de serotipos identificados en dos zonas geográficas del Ecuador.

Notas: a) *Muestra coinfectada con los serotipos DENV-1 y DENV-3.

Se comparó los serotipos identificados en pacientes ecuatorianos, reportados al sistema de vigilancia nacional, con los serotipos encontrados en este estudio. Para esto se obtuvieron los datos generales de los serotipos que co-circulan en el Ecuador según el MSP y la OPS. En el Ecuador se reportaron hasta la semana 52 del 2014 todos los serotipos del DENV mientras que en el 2015 se reportaron los serotipos DENV-1, DENV-2 y DENV-4 (MSP, 2016 y OPS, 2016). Este estudio demostró la presencia de DENV-3 en el año 2015 en la provincia de Nueva Loja.

4.3. Discusión

La vigilancia virológica basada en el vector es fundamental para fortalecer los sistemas de alerta temprana y llevar a cabo medidas de prevención oportunas antes del apareamiento de brotes de dengue. La vigilancia basada en casos

clínicos puede pasar por alto la presencia del virus en las formas asintomáticas o silentes del dengue (Kyle y Harris, 2008, p.71-92). Éste estudio evidenció una prevalencia del 9.5% de infección por DENV en mosquitos *Ae. aegypti* hembras capturadas en Nueva Loja y Esmeraldas donde la prevalencia individual fue del 7,4% y 11,6%, respectivamente. Nuestros hallazgos demostraron la presencia de DENV-1, DENV-2, DENV-3 y DENV-4 en las localidades estudiadas.

Este estudio demostró que de 1010 casas visitadas solo en el 7.5% se identificaron hembras *Ae. aegypti*. Durante la temporada de lluvia se colectaron el 85.7% (143) del total de los vectores (167) analizados. Un trabajo previo llevado a cabo en Santo Domingo de los Tsáchilas por Coba (2015, p.1-99), también encontró un alto número de vectores en la época de precipitaciones e identificó un total de 49 hembras en una sola localidad. Aunque en esta investigación se colectó vectores una vez por cada año (2014 y 2015), se evidenció gran abundancia del vector en la época lluviosa. Por su parte, Eisen et al. (2014, p.886) en un estudio desarrollado en Mérida, México, colectó vectores cada mes por dos años capturando un mayor número de vectores en la temporada de precipitaciones. En Mérida, esta temporada inicia en el mes de Mayo hasta el mes de Octubre y obtuvo un total de 1.092 mosquitos sólo en el mes de Julio. En esta época existen condiciones favorables ($T=28^{\circ}\text{C}$, humedad relativa del 70% y el aumento de criaderos) para el desarrollo del vector (Cassab et al., 2010, p. 125). Otro estudio realizado por Rubio-Palis et al. (2011, p.153) en Maracay, Venezuela registró un pico de *Aedes* (14,7 *Aedes/casa*) en el mes de Agosto (temporada de lluvias) mismo mes en el que hubo un mayor número de casos en el año 2001 demostrando que existe una correlación significativa entre el promedio del número de *Aedes* colectados y el número de casos ($r= 0,667$, $P=0,008$, 12 gdl). Esto concuerda con el estudio realizado por García et al. (2011, p.1609-1619) en Guasave Sinaloa, México en el cual evidenció una mayor abundancia de mosquitos en los meses de mayor precipitación acumulada en el año 2008 dos meses después se presentó el mayor número de casos. Además, mostró una mayor correlación de la

densidad de hembras con la precipitación acumulada ($r=0,80$) lo que evidencia que los períodos de mayor abundancia de vectores fueron los de mayor riesgo epidemiológico y que incluso estas variables se presentaron como métodos predictivos rápidos de los brotes de dengue. Aunque este estudio no llevó a cabo un análisis correlativo temporal entre factores climáticos, casos de dengue y presencia del vector, los hallazgos concuerdan con otros estudios que a inicios de la época lluviosa registran un mayor número de vectores lo que incrementa el riesgo de transmisión del virus a sujetos susceptibles.

Respecto a la prevalencia de DENV encontrada en los vectores colectados se evidenció que el 9.5% de hembras procesadas fueron positivas. Un estudio realizado en el Ecuador por Coba (2015, p. 1-99) en Sto. Domingo de los Tsáchilas únicamente en la temporada pluvial (4 meses consecutivos) demuestra una prevalencia del 24.49%. Esto pudo deberse a que su estudio fue realizado, sólo en los meses de precipitación, mientras que el presente estudio abarcó las dos temporadas del año y no se encontró la misma densidad de vectores. Así también podemos evidenciar en otro estudio realizado en el país por Triviño (2014, p.1-64) que la prevalencia de infección en el vector fue del 6,1%, aunque el estudio fue ejecutado en temporada de sequía. Esto se debe a que en la época seca el número de criaderos disminuye. Si bien existen contenedores grandes para almacenar el agua en la temporada de lluvias, los criaderos pequeños y medianos (cubetas, botellas, macetas, trastos de cocina, etc) incrementan el número de vectores generando más lugares de ovoposición (Villegas-Trejo et al., 2011, p.141-151). La presencia de una gran cantidad de mosquitos infectados puede significar un aumento en el número de futuros casos de dengue debido que existen varios pacientes asintomáticos que actúan como reservorios de la enfermedad y pueden resultar en brotes subsecuentes de dengue (Méndez-Galván et al., 2014, p.314). Es por esto que el implementar estudios virológicos del vector al sistema de vigilancia en países endémicos es de gran prioridad ya que pueden contribuir a predecir brotes epidémicos e incrementar la eficiencia del control del dengue (Méndez-Galván et al., 2014, pp.313-314).

Adicionalmente, se evidenció que el serotipo que predominó en el análisis fue el DENV-1 (50%), seguido por DENV-2 con el 31.25%, DENV-3 con el 12.5% y por último una co-infección de DENV-1 con DENV-4 con el 6.25%. De igual forma Halsey et al. (2012, p. 4) identificó un mayor porcentaje de casos con DENV-1 (39.8%) en Ecuador, Perú, Bolivia y Paraguay en un estudio realizado desde el 2005 hasta el 2010. Una razón por la que se cree que DENV-1 se manifiesta con más frecuencia es la diversificación genética de este serotipo cada cierto tiempo. El serotipo 1 va a generar mayor carga inmunitaria en contra del virus por lo que en un momento dado su prevalencia en la población disminuye mientras que la prevalencia de los otros serotipos aumenta. De igual forma esto sucederá con el resto de serotipos a lo largo del tiempo. Al haber cambiado genéticamente DENV-1, además de la existencia de una inmunidad cruzada eventualmente este serotipo vuelve a desplazar a los otros 3 serotipos e infectando a un mayor número de personas (Ocazonez-Jiménez et al., 2013, p.28). Esto demuestra que a pesar de que la densidad de vectores y la prevalencia bajen mientras haya personas susceptibles a la infección siempre se encontrarán casos de dengue en el país debido a la hiperendemicidad del virus.

El sistema de vigilancia en del Ecuador es únicamente pasivo, lo que significa que se reportan brotes dentro de las primeras 24 horas junto con una variedad de informes que contienen información rutinaria (OPS, 2011, p.20; MSP, 2012, p.14). Esta forma de recolección de datos no permite identificar la circulación de los serotipos de dengue durante los períodos inter-epidémicos lo que enlentece la capacidad predictiva y la respuesta oportuna ante nuevos brotes. Este estudio demostró la presencia de DENV-1, DENV-2 y DENV-3 al igual que una co-infección por DENV-1 con DENV-4. DENV-3 específicamente fue identificado en muestras recolectadas en el 2015. Según reportes del MSP y la OPS en el 2014 todos los serotipos del virus estuvieron circulando en el país sin embargo, en el 2015 no se reportó la circulación de DENV-3. Triviño (2014, p.1-64) encuentra en su estudio la presencia de DENV-3 en el 2013 mientras que el MSP reportó sólo la presencia de DENV-1, DENV-2 y DENV-4 en ese

mismo año. Además, Cifuentes et al. (2013, p. 1644) también detectaron la presencia de DENV-3 junto con los otros tres serotipos por lo que concluyeron que hubo una reintroducción del serotipo ya que este no se había reportado desde el 2009. Sin embargo, según la OPS (2016) el Ecuador reportó la presencia de sólo DENV-1, DENV-2 y DENV-4 en el 2011 y en el 2010 ningún serotipo fue reportado. Halsey et al. (2012, p.4) demostraron la presencia de DENV-3, DENV-4 y DENV-1 en el Ecuador en el año 2001, mientras que la OPS (2016) en este mismo año sólo tiene reportes de DENV-2 y DENV-3. Esto puede ser debido a la utilización de métodos de diagnóstico poco sensibles, una vigilancia virológica débil o incluso a pacientes que nunca fueron diagnosticados por ser asintomáticos o no haber recibido la atención necesaria (Torres y Castro, 2007, p.26-29; de la Mora et al., 2010, p. 130-132). Todos estos datos demuestran las deficiencias que tiene el sistema de vigilancia nacional. La implementación de una vigilancia activa, que actúe junto a la pasiva permite ampliar la capacidad de detección de serotipos circulantes. Mientras la vigilancia pasiva registra y recopila información a lo largo del tiempo, la vigilancia activa ayuda a garantizar la confiabilidad tanto de los datos como del sistema de vigilancia; además que reduce la probabilidad de no detectar casos que están ocurriendo en los períodos inter-epidémicos (OPS, 2011, p.20).

Este proyecto demostró la co-circulación de varios serotipos del DENV en las dos localidades estudiadas. Por esta razón el riesgo de contraer la forma grave de la enfermedad es mayor. Varios estudios atribuyen éste riesgo a la inmunopotenciación mediada por anticuerpos que resulta de infecciones previas con el virus (Ocazonez et al., 2007, p.270; Revista Panamericana de Salud Pública, 2007, p.1-2). Además, se puede observar la aparición de coinfecciones en pacientes no sólo por la circulación de varios serotipos a la vez sino también por la circulación de uno o más serotipos en un solo vector como se evidenció en una de las muestras analizadas. Baharaj et al. (2008, p.2-4) en un estudio realizado en Delhi, India, discutieron cómo esta ciudad se mantuvo hipoendémica hasta el 2003 y desde que se desarrolló la hiperendemicidad

subió el número de casos de dengue grave. Además, reportó el hallazgo de 9 pacientes con una infección simultánea de dos serotipos diferentes por lo que puede desarrollarse una sintomatología más grave. Por esta razón es muy importante que el sistema de vigilancia del dengue sea fortalecido en el Ecuador con la implementación de la vigilancia virológica basada en el vector a de generar datos más confiables que permitan crear un sistema de alerta temprana con la eficiencia necesaria que un país hiperendémico requiere (Méndez-Galván et al., 2014, p.314). Es importante realizar estudios de genotipificación con un enfoque filogenético de los serotipos circulantes encontrados en los vectores para evidenciar la diversidad de los serotipos identificados en el país. Una amplia diversidad en la población viral aumenta la probabilidad de emergencia de cepas mucho más virulentas pudiendo desencadenar brotes severos (Lee et al., 2011, p. 84-85).

La metodología se basó en el análisis individualizado de los vectores para obtener resultados más confiables en cuanto a la identificación de los serotipos circulantes. La mayoría de estudios existentes trabajan con pools de mosquitos basándose en argumentos que explican que los títulos virales pueden ser muy bajos en el vector y el RNA extraído muy poco lo que dificultaría la identificación del virus (Pankhong et al., 2002, p.143). También resulta menos costoso, más fácil y más efectivo según Sule y Oluwayelu (2016, p.2). Sin embargo, los resultados que se obtienen de un pool de mosquitos puede generar dudas como lo demostró un estudio realizado por Triviño (2014, p.37) el cual detectó 3 serotipos en uno de los pools analizados pero no pudo concluir si los serotipos pertenecían a un solo individuo o hubieron varios vectores infectados en un mismo pool. Actualmente, existen varios kits que permiten utilizar volúmenes pequeños como es el caso del RNAqueous-Micro Total RNA Isolation Kit (Thermo Fisher Scientific, USA). Este kit es capaz de trabajar con tejidos iguales o menores a 10 miligramos de peso ideal para muestras como las del presente estudio que tuvieron un peso aproximado de 2,8 miligramos. Esta metodología nos permitiría trabajar con cada individuo tal como sugieren Urdaneta et al. (2004, p.182). En su estudio, estandarizó un

nuevo método de extracción para trabajar con mosquitos individualmente para tener mayor sensibilidad en la detección del DENV. Por esta razón los beneficios de utilizar kits o técnicas de aislamiento que permitan el análisis individual de los mosquitos *Aedes* es primordial para facilitar la identificación de los serotipos circulantes e incluso la detección de una posible co-infección que pueda incrementar la probabilidad de adquirir dengue grave (Baharaj et al., 2008, p.2-4).

5. CAPÍTULO V. CONCLUSIONES

El 85.7% de los vectores fueron recolectados en la temporada de precipitaciones, periodo en el que se reportaron un mayor número de casos de dengue según el MSP.

La prevalencia de DENV en hembras *Ae. aegypti* colectadas en Esmeraldas y Nueva Loja fue del 9.5%.

El serotipo DENV-1 fue el más prevalente (50%), coincidiendo con los reportes generados por el MSP en el año 2014 y con estudios previos.

Los cuatro serotipos fueron identificados junto con una co-infección por DEN-1 y DENV-4, lo que evidencia la circulación simultánea de varios serotipos e incluso de más de un serotipo a la vez en un mismo vector.

El serotipo DENV-3 fue identificado en el año 2015. Este serotipo no fue reportado a nivel nacional por el MSP ni la OPS en este mismo año.

Al igual que otros estudios realizados en zonas endémicas de dengue se demostró que la vigilancia virológica basada en el vector es un complemento muy importante de un sistema de vigilancia, lo que apoya a generar un sistema de alerta temprana con mayor capacidad de predicción de brotes de dengue.

6. CAPÍTULO VI. RECOMENDACIONES

Modificar los cebadores para mejorar su especificidad ya que tienden a hibridarse con el genoma de *Aedes*.

Realizar una vigilancia virológica simultánea entre los habitantes de las casas muestreadas y los vectores recolectados en las mismas.

Identificar los serotipos de DENV tanto en larvas como en mosquitos adultos. Varios estudios demuestran la transmisión vertical entre mosquitos por lo que las larvas pueden generar adultos ya infectados con los diferentes serotipos.

Realizar una genotipificación con un enfoque filogenético, con el fin de identificar nuevas cepas cuyos cambios genéticos puedan resultar más virulentos o verificar si no existe la introducción de un nuevo genotipo viral.

Realizar un estudio que relacione los factores climáticos con la abundancia del vector y los casos de dengue en el país para poder ejecutar mejores predicciones de brotes epidémicos.

REFERENCIAS

- Aaskov, M. (2003). Dengue. *ADF Health*, 4, 66-70. Recuperado el 12 junio de 2015 de http://www.defence.gov.au/health/infocentre/journals/adfhj_sep03/adfhealth_4_2_66-71.pdf
- Acosta-Bas, C. y Gómez-Cordero, I. (2005). Biología y métodos diagnósticos del dengue. *Revista Biomédica*, 16(2), 113-137.
- Aguirre, J. (2004). *Análisis Espacial de la Intensidad de las Enfermedades Infectocontagiosas en Guayaquil*. (Tesis inédita de pregrado). Escuela Superior Politécnica del Litoral. Guayaquil, Ecuador.
- Akbar MR, Agoes R, Djatie T, Kodyat S. (2008). PCR detection of Dengue transovarial transmissibility in *Aedes aegypti* in Bandung, Indonesia. *Proc ASEAN Congr Trop Med Parasitol*, 3, 84-9.
- Almirón. (2009). Ficha técnica de *Aedes aegypti*. Recuperado el 19 de junio 2016 de <http://www.es.slideshare.net/guest375d93/ficha-tnica-de-aedes-aegypti-2009>
- Andrade, C. (2016). Provincias y capitales del mapa de Ecuador. Recuperado el 15 de junio de <http://www.sinmiedosec.com/provincias-y-capitales-del-mapa-de-ecuador/>
- Ángel, R. (2006). Entrada del virus de dengue: Moléculas que pueden modular la patogenia viral. *Cinvestav*, 38-43.
- Arunachalam, N. (2010). Determinantes ecobiosociales de la reproducción del vector del dengue: estudio multipaís en zonas urbanas y semiurbanas de Asia. *Boletín de la Organización Mundial de la Salud*, Vol 88, 161-240. Recuperado el 19 agosto de <http://www.who.int/bulletin/volumes/88/3/09-067892-ab/es/>
- Bacallao, G. y Quintana, O. (s.f.). Dengue. Revisión bibliográfica. Artículo de revisión. 1-3.
- Basker, P., Kannan, P., Thirugnanasambandam, R., Saravanan, S., Sridharan, S. Y Kadhiresan, M. (2013). Study on entomological surveillance and it's significance during a dengue outbreak in the district of Tirunelveli

- in Tamil Nadu, India. *Osong Public Health Res Perspect*, 4 (3), 152-158.
- Bernal, A. (2013). Vacuna candidata contra el dengue podría cambiar millones de vidas. *México: Sanofi-Pasteur*. Recuperado el 21 de septiembre de 2016 de <http://www.sanofipasteur.com/es/articulos/sanofi-pasteur-s-dengue-vaccine-candidate-successfully-completes-final-landmark-phase-3-clinical-efficacy-study-in-latin-america.aspx>.
- Bharaj, P., Chahar, H., Pandey, A., Diddi, K., Dar, L., Guleria, R., Kabra, S. y Broor, S. (2008). Concurrent infections by all four dengue virus serotypes during an outbreak of dengue in 2006 in Delhi, India. *Virology Journal*, 1-5.
- Cafferata, M., Bardach, A., Rey-Ares, L., Alcaraz, A., Cormick, G., Gibbons, L., Romano, M., Cesaroni, S. y Ruvinsky, S. (2013). Dengue Epidemiology and Burden of Disease in Latin America and the Caribbean: A Systemic Review of the Literature and Meta-Analysis. *Elsevier: Value In Health Regional Issues*. 2, 347-356.
- Cahyo, K., Yamanaka, A., Yotopranoto, S. y Konishi, E. (2012). Vertical transmission of dengue virus in *Aedes aegypti* collected in Surabaya, Indonesia, during 2008-2011. *Jpn. J. Infect. Dis.*, 65, 274-276.
- Carbajo, A., Gómez, S., Curto, S. y Schweigmann, N. (2004). Variación Espacio- Temporal del Riesgo de Transmisión del Dengue en la ciudad de Buenos Aires. *MEDICINA*, 64,231-234
- Cassab, A., Morales, B. y Mattar, S. (2010). Factores climáticos y casos de dengue en Montería, Colombia. 2003-2008. *Rev. Salud pública*, 13(1), 115-128.
- Centro Nacional de Programas Preventivos y Control de Enfermedades. (2014). *Clasificación Taxonómica de los Vectores del Dengue en México*. Recuperado el 14 de enero de 2016 de <http://www.cenaprece.salud.gob.mx/programas/interior/vectores/dengue/vector/.html>

- Chen, Y., MaGuire, T. y Marks, R. (1996). Demonstration of binding of dengue virus envelope protein to target cells. *Journal of Virology*. 70(12), 8765-8772.
- Chow, V., Chan, Y. C., Yong, R., Lee, K., Lim, L., Chung, Y., Lam-Phua, S. y Tan, B. (1998). Monitoring of dengue viruses in field-caught *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* mosquitoes by a type-specific polymerase chain reaction and cycle sequencing. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 58(5), 578-576.
- Cifuentes, S. (2013). *Vigilancia Molecular del Dengue en un Área Remota de la Costa Norte del Ecuador usando Muestras de Suero y Sangre Capilar Tomada en Papel Filtro*. (Tesis de Maestría, Universidad San Francisco de Quito: Colegio postgrados). Recuperado el 18 de enero de 2016 de <http://www.repositorio.usfq.edu.ec/bitstream/23000/1689/1/103461.pdf>.
- Clark, G. (1995). Situación Epidemiológica del Dengue en América. Desafíos para su Vigilancia y Control. *Salud Pública Mex*, 37,5-11.
- Clemons, A., Haugen, M., Flannery, E., Tomchaney, M., Kast, K., Jacowski, C., Le, C., Mori, A., Simanton, W., Sarro, J., Severson, D. y Duman-Scheel, M. (2010). *Aedes aegypti*: An Emerging Model for Vector Mosquito Development. *Cold Spring Harb Protoc*.
- Coba, J. (2015). Prevalencia y serotipificación del virus del dengue mediante RT-PCR en *Aedes aegypti* capturados en la cooperativa de vivienda provincias unidas en Santo Domingo, Ecuador. (Tesis de grado, Universidad Politécnica Salesiana: Ingeniería en biotecnología de los recursos naturales). Recuperado el 15 de enero de 2016 de <http://www.dspace.ups.edu.ec/handle/123456789/9049>
- Conde, A. (2003). *Estudio de la longevidad y el ciclo gonotrófico del Aedes (Stegomyia) aegypti (Linnaeus, 1762), cepa Girardot (Cundinamarca) en condiciones de laboratorio*. (Tesis de grado, Pontificia Universidad Javeriana: Facultad de Ciencias). Recuperado 10 de

febrero de 2016 de
<http://www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencia/tesis51.pdf>

- Daughaday, C., Brandt, W., McCown, J. Russell, P. (1981). Evidence for two mechanisms of dengue virus infections of adherent human monocytes: trypsin-sensitive virus receptors and trypsin-resistant immune complex receptors. *Infection and Immunity*, 32(2), 469-473.
- De la Mora, A., Jiménez, F. y Treviño, S. (2010). Distribución geoespacial y detección del virus del dengue en mosquitos *Aedes (Stegomyia) aegypti* de Ciudad Juarez, Chihuahua, México. *Salud Pública de México*. 52(2), 127-133.
- Dean, A. G., Sullivan, K. M. y Soe, M. M.(2013). OpenEpi: open source epidemiologic statistics for public health, version 3.0.1. Recuperado el 20 de febrero de 2016 de http://www.openepi.com/menu/oe_menu.htm
- Distrito Metropolitano de Quito. (2012). Plan Metropolitano de Ordenamiento Territorial. Ordenanza Municipal No. O171.
- Duebel, V., Kinney, R. y Trent, D. (1986). Nucleotide Sequence and Deduced Amino Acid Sequence of the Structural Proteins of Dengue Type 2 Virus, Jamaica Genotype. *Virology*, 155, 365-377.
- Ecuale. (2015). *Provincia de Sucumbios*. Recuperado el 10 de marzo de 2016 de <http://www.ecuale.com/sucumbios/>
- Einsen, L., García-Rejón, J., Gómez-Carro, S., Nájera, M., Keefe, T., Beaty, D. y Loroño-Pino, M. (2014). Temporal Correlations Between Mosquito-Based Dengue Virus Surveillance Measures or Indoor Mosquito Abundance and Dengue Case Number in Mérida City, México. *J.Med.Entomol.* 51(4): 885-890.
- Fernández, L. y Torrado, Y. (2015). Fiebre Chikungunya. *Rev. Cubana. Med.*, 54(1), 64-96.
- Francis, G. y García, L. (2012). *Alteraciones hematológicas en el hemograma y su relación con el dengue en los pacientes que acuden al área de laboratorio clínico del Hospital del IESS de la ciudad de Portoviejo.*

- (Tesis de Pregrado). Universidad Técnica de Manabí. Manabí, Ecuador.
- García, C., García, L., Espinosa, L. y Ley, C. (2011). Abundancia y distribución de *Aedes aegypti* (Díptera: Culicidae) y dispersión del dengue en Guasave Sinaloa, México. *Rev. Biol. Trop.*, 59(4), 1609-1619.
- Gubler, D. (2011). Dengue, Urbanization and Globalization: The Unholy Trinity of the 21st Century. *Tropical Medicine and Health*, 39(4), 3-11.
- Gubler, D. J. (1989). *Aedes aegypti* and *Aedes aegypti*-born disease control in the 1990's: top down or bottom up. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 40(6), 571-578.
- Gubler, D.J. (1998). Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever. *Clinical Microbiology*. Vol 11: 480-496.
- Gubler, D.J. (2002). How effectively is epidemiological surveillance used for dengue programme planning and epidemic response?. *Dengue bulletin*. Vol 26.
- Gubler, D.J. (2006). Dengue/dengue hamorrhagic fever: history and current status. *In Novartis foundation symposium*. Vol. 277, p.3-4.
- Guzmán, M., García G. y Kourí, G. (2006). El dengue y el dengue hemorrágico: prioridades de investigación. *Panam Salud Pública*. 204-215.
- Halsey, E., Marks, M., Gotuzzo, E., Fiestas, B., Suarez, L., Vargas, J., Aguayo, N., Madrid, C., Vimos, C., Kochel, T. y Laguna, A. (2012). Correlation of serotype-specific dengue virus infection with clinical manifestations. *Plos. Negl. Trop. Dis.*, 6(5), 1-10. doi: 10.1371-journal.pntd.0001638
- Harris, E., Roberts, T., Smith, L., Selle, J., Kramer, L., Valle, S., Sandoval, E. y Balmaseda, A. (1998). Typing of dengue viruses in clinical specimens and mosquitoes by single-tube multiplex reverse transcriptase PCR. *J Clin Microbiol*, 36(9), 2634-2639
- Hartanti, M., Suryani y Tirtadjaja, I. (2010). Dengue virus transovarial transmission by *Aedes aegypti*. *Univ Med* 29: 65-70.
- Hernández, F. y García, J. (2000). *Aedes*, Dengue y la posibilidad de un enfoque diferente de lucha. *Rev Costarric. Salud Pub*, 9.

- Honório, N., Costa, W., Leite, P., Gonçalves, J., Lounibos, L., y Lourenço-de-Oliveira, R. (2003). Dispersal of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in an urban endemic dengue área in the State of Rio de Janeiro, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 98(2), 191-198.
- Ibañez-Bernal, S. y Gómez-Dantés. H. (1995). Los vectores del dengue en México: una revisión crítica. *Suplemento de 1995*. Vol 37: 53-63.
- Ibarra, A., Ryan, S., Beltrán, E., Mejía, R., Silva, M. y Muñoz, A. (2013). Dengue Vector Dynamics (*Aedes aegypti*) Influenced by Climate and Social Factors in Ecuador: Implications for Targeted Control. *PLoS ONE*, 8(11), 1-11.
- Inmunopatogenia del dengue hemorrágico-síndrome de choque por dengue. (2007). *Rev. Panam. Salud Pública*, 22(3), 218-219.
- Instituto Nacional de Investigación de Salud Pública. (2016). Propuesta del proyecto: Sistema Nacional de Vigilancia y Alerta Temprana para el Control del Vector del Dengue y Fiebre Amarilla.
- Jaramillo, C. y Martínez, J. (2010). Epidemiología veterinaria. México. El Manual Moderno.
- Joshi, V., Mourya, D.T. y Sharma, R.C. (2002). Persistence of Dengue-3 Virus Through Transovarial Transmission Passage in Successive Generations of *Aedes aegypti* Mosquitoes. *Am.J.Trop.Med.Hyg.*, 67(2), 158-161.
- Khoo, C., Doty, J., Held, N., Olson, K. y Franz, A. (2013). Isolation of midgut escape mutants of two American genotype dengue 2 viruses from *Aedes aegypti*. *Virology journal*, 10(1), 257.
- Kyle, J. y Harris, E. (2008). Global spread and persistence of dengue. *Annu. Rev. Microbiol*, 62, 71-92.
- Lanciotti, R., Calisher, C., Gubler, D., Chang, G. y Vorndam, V. (1992). Rapid Detection and Typing of Dengue Viruses from Clinical Samples by Using Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction. *Journal of Clinical Microbiology*, 30(3), 545-551.

- Laredo-Tiacareño, S., Guo, X. y Bocanegra-García, V. (2012). Virus del dengue: estructura de serotipos y epidemiología molecular. *CienciaUAT*, 6(3), 27-33.
- Lee, K.S., Lo, S., Siok-Yin Tan, S., Chua, R., Tan, L. K., Xu, H., y Ng, L. C. (2011). Dengue virus surveillance in Singapore reveals high viral diversity through multiple introductions and *in situ* evolution. *Infection, genetics and evolution*, 12, 77-85.
- Leví-Castillo, R. (1943). Importancia sanitaria del control biológico de los mosquitos. Evolución histórica de los métodos de lucha antimosquito. *Boletín Del Instituto Botánico de la Universidad Central*, 2(3-4), 129-158.
- Lossa, G., Gómez, D., Vairetti, J., Peralta, N. y Telo, I. (s,f). *Conceptos de vigilancia aplicados a las Infecciones Hospitalarias*. Argentina: Ministerio de Salud.
- Mairuhu, A., Wagenaar, J., Brandjes, D.P.M. y Van Gorp, E.C.M. (2004). Dengue: an arthropod-borne disease of global importance. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis*, 23,425-433. doi: 10.1007/s10096-004-1145-1
- Martinez-Vega, R., Díaz-Quijano, F. y Villar-Centeno, L. (2006). Dificultad para el diagnóstico clínico temprano del dengue en un área endémica y su impacto sobre el manejo médico inicial. *Revista médica*. 1153-1160.
- Mason, P., McAda, P., Mason, T. y Fournier, M. (1987). Sequence of the Dengue-1 Virus Genomes in the Region Encoding the Three Structural Proteins and the Major Nonstructural Protein NS1. *Virology*, 161, 262-267.
- Matheus, S., Chappert, J., Cassadou, S. Berger, F., Labeau, B., Bremand, L., Winicki, A., Huc-Anais, P., Quenel, P. y Dussart, P. (2012). Virological Surveillance of Dengue in Saint Barthélemy, French West Indies, Using Blood Samples on Filter Paper. *Am. J. Trop. Med. Hyg*, 86(1), 159-165

- McBride, W. y Bielefeldt-Ohmann, H. (2000). Dengue viral infections; pathogenesis and epidemiology. *Microbes and Infection*, 2, 1041-1050.
- Medina, J. y Torres, C. (s.f.). Revisión bibliográfica de los mecanismos moleculares involucrados en la infección por el virus del dengue y los posibles blancos antivirales. *Hipertextos del área de la biología de la Universidad del Nordeste*, 1-17.
- Méndez-Galván, J., Sanchez-Casas, R., Gaitan-Burns, A., Díaz-González., E., Ibarra-Juarez, L., Medina de la Garza, C., Dominguez, M., Mis, P. y Fernandez, I. (2014). Detection of *Aedes aegypti* mosquitoes infected with dengue virus as a complementary method of increasing the sensitivity of surveillance: Identification of serotypes 1, 2, and 4 by RT-PCR in Quitana Roo, Mexico. *Southwestern Entomologist*, 39(2), 307-316. doi: 10.3958/059.039.0208
- Ministerio de Salud de la Nación. (2013). *Guía para el equipo de salud*. Recuperado el 13 de abril de 2016 de <http://www.msal.gov.ar/images/stories/epidemiologia/pdf/guia-dengue.pdf>
- Ministerio de Salud Pública. (2012). Normas del sistema integrado de vigilancia epidemiológica del Ecuador (SIVE). Primera edición. De 1-25.
- Ministerio de Salud Pública. (2013). *Ecuador: Boletín epidemiológico No. 39 de la situación de Dengue en el Ecuador 2013*. Recuperado el 18 de abril de 2016 de <http://www.salud.gob.ec/boletin-epidemiologico-no-39-de-la-situacion-de-dengue-en-el-ecuador-2013/>
- Ministerio de Salud Pública. (2013). *Ecuador: Boletín Epidemiológico No. 9 de la situación del Dengue en el Ecuador 2013*. Recuperado el 16 de abril de 2016 de <http://www.salud.gob.ec/tag/dengue-ecuador/>
- Ministerio de Salud Pública. (2016). Gaceta epidemiológica No. 52 del 2014. Recuperado el 22 de marzo de 2016 de <http://www.salud.gob.ec/gaceta-epidemiologica-ecuador-sive-alerta/>

- Miró, V., Díaz, A., Borrell, M. y Cabrerías, A. (2008). Estratificación para la vigilancia entomológica del dengue. *Revista Cubana de Medicina Tropical*, 61(2).
- Montero, G. (2009). Biología de *Aedes aegypti*. Blog FCA, 1-4.
- Mourya DT., Gokhale MD. Y Banerjee K. (1994). Effect of sublethal dosages of insecticides on Chikungunya virus susceptible and refractory strains of *Aedes aegypti*. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 25: 536–542.
- Muller, D., Frentiu, F., Rojas, A., Moreira, L., O'Neill, S. y Young, P. (2012). A portable approach for the surveillance of dengue virus-infected mosquitoes. *Journal of Virological Methods*, 183, 90-93.
- Murray, N., Quam M. y Wilder-Smith, A. (2013). Epidemiology of dengue: past, present and future prospects. *Clinical Epidemiology*, 5,299-309.
- Nene, V., et al. (2007). Genome Sequence of *Aedes aegypti*, a Major Arbovirus Vector. *Science*, 316, 1718. doi: 10.1126/science.1138878
- Ocazonez-Jiménez, R., Ortiz, A., Gómez, S. y Miranda, D. (2013). Virus del dengue de serotipo 1 (DENV-1) de Colombia: su contribución a la presentación del dengue en el departamento de Santander. *Biomedica*, 33, 22-30.
- Ocazonez, R., Gómez, S. y Cortez, F. (2007). Serotipo, patrón de infección y dengue hemorrágico en área endémica colombiana. *Rev. Salud Pública*, 9(2), 262-274.
- Organización Mundial de la Salud. (2009). *Dengue: Guías para el diagnóstico, tratamiento, prevención y control*. Recuperado el 29 de abril de 2016 de http://www.who.int/topics/dengue/9789995479213_spa.pdf.
- Organización Mundial de la Salud. (2012). Dengue y dengue hemorrágico. *Boletín epidemiológico* 14(4). Pp.2-21.
- Organización Mundial de la Salud. (2016). Dengue and severe dengue. Recuperado el 01 de marzo de 2016 de <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/en/>
- Organización Panamericana de la Salud. (1995). *Dengue y dengue hemorrágico en las Américas: guía para la prevención y control de*

dengue. Recuperado el 08 de marzo de 2016 de <http://www1.paho.org/spanish/hcp/hct/vbd/arias-dengue.htm>

Organización Panamericana de la Salud. (2009). 2009: Number of Reported Cases of Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever (DHF)* in the Americas, by Country. Recuperado el 03 de marzo de 2016 de http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_topics&view=rdmore&cid=6290&Itemid=40734

Organización Panamericana de la Salud. (2010). 2010: Number of Reported Cases of Dengue and Severe Dengue (SD) in the Americas, by Country (EW 52). Recuperado el 07 de mayo de 2016 de http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_topics&view=rdmore&cid=6290&Itemid=40734

Organización Panamericana de la Salud. (2011). Módulo de principios de epidemiología para el control de enfermedades. Segunda edición revisada. 1-54.

Organización Panamericana de la Salud. (2013). 2013: Number of Reported Cases of Dengue and Severe Dengue in the Americas, by Country (EW 52). Recuperado el 07 de junio de 2016 de http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_topics&view=rdmore&cid=6290&Itemid=40734

Organización Panamericana de la Salud. (2015). Descripción de la situación epidemiológica actual del dengue en las Américas. Recuperado el 05 de septiembre del 2016 de http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=4494:descripcion-situacion-epidemiologica-actual-dengue-americas&Itemid=2481&lang=es.

Organización Panamericana de la Salud. (2016). Dengue: datos, mapas y estadísticas de OPS/OMS. Recuperado el 08 de junio de http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_topics&view=rdmore&cid=6290&Itemid=40734

Organización Panamericana de la salud. (2016). Información general: Dengue. Recuperado el 28 de diciembre de 2015 de

[http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article
&id=4493&itemid=40232&lang=es](http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=4493&itemid=40232&lang=es)

- Organización Panamericana de la Salud. (2016). Number of Reported Cases of Dengue and Severe Dengue (SD) in the Americas, by Country (EW 52). Recuperado el 01 de septiembre del 2016 de http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&task=doc_view&Itemid=270&gid=32911&lang=es.
- Ortega, L. (2001). Dengue: Un problema siempre emergente. *RESUMED*, 14(2), 41-52.
- Osatomi, K. y Sumiyoshi, H. (1990). Complete Nucleotide Sequence of Dengue Type 3 Virus Genome RNA. *Virology*, 176, 643-647.
- Pankhong, P., Siriprasertkul, W., Patpoparn, S., Srisuphanunt, M., Rojanapremsuk, J., Sithiprasasna, R., Coleman, R., Nisalak, A., Endy, T., Attatippaholkun, M. y Attatippaholkun, W. (2002). Molecular serotyping of dengue viruses in field-caught *Aedes* mosquitoes by in-house RNA extraction/RT-PCR reagent kits. *Southeast Asian. J. Trop. Med. Public Health.*, 33, 139-144.
- Pleitez. (2010). Dengue 2010 para clínicos. Recuperado 12 de diciembre de 2015 de <http://www.es.slideshare.net/paz08/dengue-2010-para-clnicos-5119400>
- Puentes, J. (2011). *Análisis de la respuesta inmunitaria inflamatoria en la infección por el virus dengue y su significancia clínica*. (Tesis doctoral, Universidad de Alcalá: Departamento de medicina). Recuperado el 16 de noviembre de 2015 de <http://www.dspace.uah.es/dspace/handle/10017/14281>
- Querales, J. (2002). Dengue: Causas, características clínicas y prevención. *Gac Méd Caracas*, 110(3), 328-332.
- Quintero, D., Osorio, J. y Martínez-Gutiérrez, M. (2010). Competencia vectorial: consideraciones entomológicas y su influencia sobre la epidemiología del Dengue. *IATREIA*: Vol 23.
- Regato, M., Mosquera, C., Coloma, J., Mosquera, C., & Alava, A. (2006). Aplicación de la RT-PCR de un solo paso en el diagnóstico

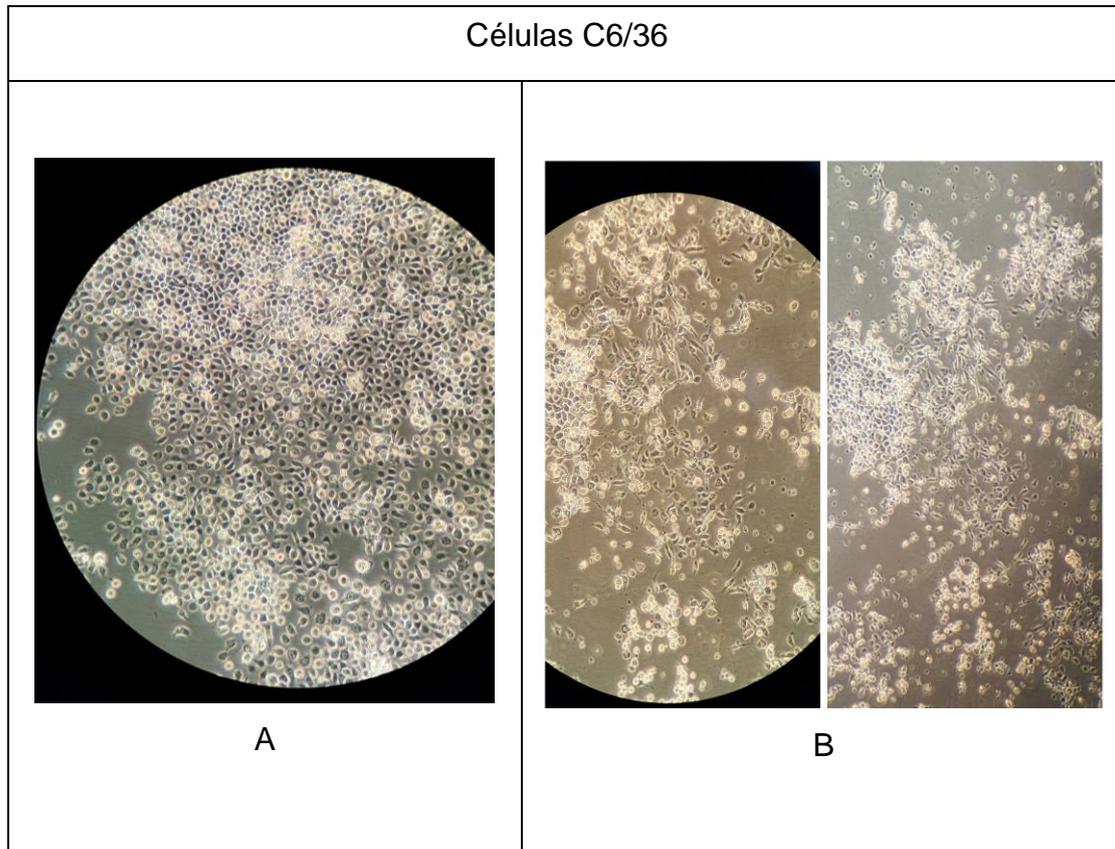
- tipificación de las cepas circulantes del virus del dengue en el Ecuador. *Rev Ecuat Hig Med Trop*, 43 (2), 11-18.
- Rivas, R. (2005). *Análisis del comportamiento clínico y epidemiológico del dengue clásico y del dengue hemorrágico en Costa Rica*. (Tesis de grado, Universidad de Costa Rica: Facultad de Microbiología). Recuperado de <http://www.repositorio.sibdi.ucr.ac.cr:8080/jspui/bitstream/123456789/1035/1/25767.pdf>
- Rivera, A. y Rodriguez, A. (2010). Actualización en aspectos epidemiológicos y clínicos del dengue. *Revista Cubana de Salud Pública*, 36(1), 149-164.
- Rodriguez, D., Castillo, P. y Aguilar, C. (1995). Glosario de términos en salud ambiental. *Mepetec*. Recuperado de: <http://www.osman.es/ficha/14321>
- Rodriguez, R. (2002). Estrategias para el control del dengue y del *Aedes aegypti* en las Américas. *Rev Cubana Med Trop*, 54(3), 189-201.
- Romero, L. (2012). *Vigilancia y Control en Salud Pública*. (Versión 01). Colombia: Grupo Funcional Enfermedades Transmitidas por Vectores.
- Rubio-Palis, Y., Pérez, L., Infante, M., Comach, G. y Urdaneta, L. (2011). Influencia de las variables climáticas en la casuística de dengue y la abundancia de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) en Maracay, Venezuela. *Boletín de malariología y salud ambiental*, L1(2), 145-158.
- Sabin, A. (1952). Research on Dengue during World War II. *Am.J. Trop. Med. Hyg.*, 1(1), 30-50.
- Salvatella, R. (1996). *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus* (Diptera, Culicidae) y su papel como vectores en las Américas. La situación de Uruguay. *Rev. Med. Uruguay*, 12, 28-36.
- San Martín, J. y Brathwaite-Dick, O. (2007). La estrategia de gestión integrada para la prevención y el control del dengue en la región de las Américas. *Rev Panam Salud Pública*, 21(1), 55-63.

- Somers, G., Brown, J., Barrera, R. y Powell, J. (2011). Genetics and Morphology of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) in Septic Tanks in Puerto Rico. *J medical Entomology*, 48(6), 1095-1102. doi:10.1603-ME11129
- Stewart, A., Ryan, S., Beltrán, E., Mejía, R., Silva, M. y Muñoz, A. (2013). Dengue Vector Dynamics (*Aedes aegypti*) Influenced by Climate and Social Factors in Ecuador: Implications for Targeted Control. *PLoS ONE*, 8(11), e78263. doi:10.1371/journal.pone.0078263
- Sule, W. y Oluwayelu, D. (2016). Analysis of *Culex* and *Aedes* mosquitoes in southwestern Nigeria revealed no West Nile virus activity. *Pan. African. Medical. Journal*, 1-10.
- Terazón, O. y Terazón M. (2012). Enfoque de riesgo en la prevención del dengue. *Medisan*, 16(9), 1428-1437.
- Torres, J. y Castro, J. (2007). The health and economic impact of dengue in Latin America. *ARTIGO*, 23-31.
- Triviño, K. (2014). *Determinación molecular del virus del dengue presente en mosquitos Aedes aegypti de diferentes localidades del Ecuador, mediante la técnica de RT-PCR*. (Tesis inédita de pregrado) Universidad Escuela Politécnica del Ejército. Sangolquí, Ecuador.
- Tuiskunen, A. y Lundkvist, A. (2013). Dengue viruses-an overview. *Infection Ecology and Epidemiology*, 3(19839).
- Urdaneta, L., Herrera, F., Pernalete, M., Zoghbi, M., Rubio-Palis, Y., Barrios, R., Rivero, J., Comach, G., Jiménez, M. y Salcedo, M. (2004). Detection of dengue viruses in field-caught *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) in Maracay, Aragua state, Venezuela by type-specific polymerase chain reaction. *Infection, Genetics and Evolution*, 5, 177-184
- Usme-Ciro, J., Méndez, J., Laiton, K. y Páez, A. (2014). *The relevance of dengue virus genotypes surveillance at country level before vaccine approval*. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, 10:9, 2674-2678. doi:10.4161/hv.29563
- Velandia, M. y Castellanos, J. (2011). Virus del dengue: Estructura y ciclo viral. *Infectio*, 15(1), 33-43.

- Vikram, K., Nagpal, B., Pande, V., Srivastava, A., Saxena, N., Singh, H., Anushrita, Gupta, S., Tuli, N., Yadav, N., Olivier, T., Richard, P. y Valecha, N. (2015). Detection of dengue virus in individual *Aedes aegypti* mosquitoes in Delhi, India. *J. Vector. Borne. Dis*, 52,129-133.
- Villegas, A., Che, A., González, M., Guillermo, G., González, H., Dzul, F., Ulloa, A., Danis, R. y Manrique, P. (2011). Control enfocado de *Aedes aegypti* en localidades de alto riesgo de transmisión de Dengue en Morelos, México. *Salud Pública Mex.*, 53(2), 141-151.
- Vong, S. Khieu, V., Glass, O., Ly, S., Duong, V., Huy, R., Ngan, C. Wichmann, O., Letson, G., Margolis, H. y Buchy, P. (2010). Dengue Incidence in Urban and Rural Cambodia: Results from Population-Based Active Fever Surveillance, 2006-2008. *Plos Negl Trop Dis*, 4(11), e903. doi: 10.1371/journal.pntd.0000903
- Wahala, W. y Silva, A. (2011). The Human Antibody Response to Dengue Virus Infection. *Viruses*, 3, 2374-2395. doi: 10.3390/v3122374
- Westaway, E., Mackenzie, J., Kenney, M., Jones, M. y Khromykh, A. (1997). Ultrastructure of kunjin virus-infected cells: colocalization of NS1 and NS3 with double-stranded RNA, and of NS2B with NS3, in virus-induced membrane structures. *Journal of Virology*. 71(9), 6650-6661.
- Zhao, B., Mackow, E., Buckler-White, A., Markoff, L., Chanock, R., Lai, C. y Makino, Y. (1986). Cloning Full-Length Dengue Type 4 DNA Sequences: Analysis of Gene Coding for Structural Proteins. *Virology*, 155, 77-88.

ANEXOS

Anexo A. Imágenes observadas por microscopía invertida (10X).



Nota: Cultivo celular de células C6/36 y células en cultivo con efectos citopáticos. A. Células C6/36 previamente a la infección con DENV. B. Células infectadas, presentan alargamiento, muerte celular y múltiples núcleos.

Anexo B. Tiempos de cosecha según el serotipo.

Serotipo	Tiempo desde la inoculación hasta la cosecha
DENV-1	7 horas
DENV-2	5-7 días
DENV-3	5-7 días
DENV-4	5-7 días

Anexo C: Base de datos de las muestras colectadas en Esmeraldas

Fecha Colecta	Año Colecta	Época	Localidad	Nmr_Csa	Nmr_Mst	cantidad de hembras	Coordenada_X	Coordenada_Y	Género	especie	Sexo	Fecha_Identificación	Método_Identificación (Col23)	Estadio_Vida	DNA/RNA	ng/μL	260/208	SEROTIPO
08/04/2014	2014	seco	Esmeraldas	40	40	1	-	-	<i>Aedes</i>	<i>aegypti</i>	hembra	08/04/2014	Morfología	Adulto	RNA	165.828	2.102	
08/04/2014	2014	seco	Esmeraldas	51	51	1	-	-	<i>Aedes</i>	<i>aegypti</i>	hembra	08/04/2014	Morfología	Adulto	RNA	86.675	2,14	
08/04/2014	2014	seco	Esmeraldas	53	53	1	79,68707	0,91075	<i>Aedes</i>	<i>aegypti</i>	hembra	08/04/2014	Morfología	Adulto	RNA	51.801	2.133	
08/04/2014	2014	seco	Esmeraldas	58	58	1	79,6809	0,91073	<i>Aedes</i>	<i>aegypti</i>	hembra	08/04/2014	Morfología	Adulto	RNA	66.491	2.158	DEN1(ALIMENTADA)
08/05/2014	2014	seco	Esmeraldas	62	62	1	70,6858	0,91059	<i>Aedes</i>	<i>aegypti</i>	hembra	08/05/2014	Morfología	Adulto	RNA	65,08	2.162	
08/05/2014	2014	seco	Esmeraldas	67	67	1	79,68633	0,90965	<i>Aedes</i>	<i>aegypti</i>	hembra	08/05/2014	Morfología	Adulto	RNA	98.234	2.161	
08/05/2014	2014	seco	Esmeraldas	67	67	1	79,68633	0,90965	<i>Aedes</i>	<i>aegypti</i>	hembra	08/05/2014	Morfología	Adulto	RNA	161.526	2.211	
08/05/2014	2014	seco	Esmeraldas	69	69	1	79,68612	0,90964	<i>Aedes</i>	<i>aegypti</i>	hembra	08/05/2014	Morfología	Adulto	RNA	151.741	1,39	
08/05/2014	2014	seco	Esmeraldas	69	69	1	79,68612	0,90964	<i>Aedes</i>	<i>aegypti</i>	hembra	08/05/2014	Morfología	Adulto	RNA	84,65	2,111	
08/05/2014	2014	seco	Esmeraldas	69	69	1	79,68612	0,90964	<i>Aedes</i>	<i>aegypti</i>	hembra	08/05/2014	Morfología	Adulto	RNA	125,86	2.116	
08/06/2014	2014	seco	Esmeraldas	85	85	1	79,68447	0,90847	<i>Aedes</i>	<i>aegypti</i>	hembra	08/06/2014	Morfología	Adulto	RNA	74.194	2.205	
08/06/2014	2014	seco	Esmeraldas	88	88	1	79,68398	0,90803	<i>Aedes</i>	<i>aegypti</i>	hembra	08/06/2014	Morfología	Adulto	RNA	66.814	2	
08/06/2014	2014	seco	Esmeraldas	94	94	1	79,688	0,90953	<i>Aedes</i>	<i>aegypti</i>	hembra	08/06/2014	Morfología	Adulto	RNA	132.847	2,172	

08/06/2014	2014	seco	Esmeraldas	94	94	1	79,688	0,90953	<i>Aedes</i>	<i>aegypti</i>	hembra	08/06/2014	Morfología	Adulto	RNA	52,61	2.131	
08/06/2014	2014	seco	Esmeraldas	94	94	1	79,688	0,90953	<i>Aedes</i>	<i>aegypti</i>	hembra	08/06/2014	Morfología	Adulto	RNA	62.437	2.232	
08/06/2014	2014	seco	Esmeraldas	94	94	1	79,688	0,90953	<i>Aedes</i>	<i>aegypti</i>	hembra	08/06/2014	Morfología	Adulto	RNA	127,72	2.079	
08/06/2014	2014	seco	Esmeraldas	94	94	1	79,688	0,90953	<i>Aedes</i>	<i>aegypti</i>	hembra	08/06/2014	Morfología	Adulto	RNA	73.879	2.045	
08/07/2014	2014	seco	Esmeraldas	95	95	1	79,68768	0,90943	<i>Aedes</i>	<i>aegypti</i>	hembra	08/07/2014	Morfología	Adulto	RNA	185.877	2.213	
08/07/2014	2014	seco	Esmeraldas	96	96	1	79,68685	0,90889	<i>Aedes</i>	<i>aegypti</i>	hembra	08/07/2014	Morfología	Adulto	RNA	54.912	2.143	
08/07/2014	2014	seco	Esmeraldas	96	96	1	79,68685	0,90889	<i>Aedes</i>	<i>aegypti</i>	hembra	08/07/2014	Morfología	Adulto	RNA	105.947	2.193	
08/07/2014	2014	seco	Esmeraldas	108	108	1	79,68596	0,90837	<i>Aedes</i>	<i>aegypti</i>	hembra	08/07/2014	Morfología	Adulto	RNA	32.062	1.436	
08/07/2014	2014	seco	Esmeraldas	108	108	1	79,68596	0,90837	<i>Aedes</i>	<i>aegypti</i>	hembra	08/07/2014	Morfología	Adulto	RNA	29.095	2.212	
08/07/2014	2014	seco	Esmeraldas	108	108	1	79,68596	0,90837	<i>Aedes</i>	<i>aegypti</i>	hembra	08/07/2014	Morfología	Adulto	RNA	3.622	3	DEN1(ALIMENTADA)
08/07/2014	2014	seco	Esmeraldas	114	114	1	79,68544	0,90782	<i>Aedes</i>	<i>aegypti</i>	hembra	08/07/2014	Morfología	Adulto	RNA	36.854	1.936	
05/04/2015	2015	lluvia	Esmeraldas	10	10	1	-	-	<i>Aedes</i>	<i>aegypti</i>	hembra	05/04/2015	Morfología	Adulto	RNA	143.691	1,313	
05/04/2015	2015	lluvia	Esmeraldas	10	10	1	-	-	<i>Aedes</i>	<i>aegypti</i>	hembra	05/04/2015	Morfología	Adulto	RNA	100.041	1,692	
05/04/2015	2015	lluvia	Esmeraldas	10	10	1	-	-	<i>Aedes</i>	<i>aegypti</i>	hembra	05/04/2015	Morfología	Adulto	RNA	138.458	1.849	
05/04/2015	2015	lluvia	Esmeraldas	12	12	1	-	-	<i>Aedes</i>	<i>aegypti</i>	hembra	05/04/2015	Morfología	Adulto	RNA	49.929	2.158	

05/04/2015	2015	lluvia	Esmeraldas	14	14	1	79,64616	0,94584	<i>Aedes</i>	<i>aegypti</i>	hembra	05/04/2015	Morfología	Adulto	RNA	74.462	2.229	
05/04/2015	2015	lluvia	Esmeraldas	14	14	1	79,64616	0,94584	<i>Aedes</i>	<i>aegypti</i>	hembra	05/04/2015	Morfología	Adulto	RNA	54.273	1.861	DEN1
05/04/2015	2015	lluvia	Esmeraldas	16	16	1	-	-	<i>Aedes</i>	<i>aegypti</i>	hembra	05/04/2015	Morfología	Adulto	RNA	115.431	2.111	
05/04/2015	2015	lluvia	Esmeraldas	16	16	1	-	-	<i>Aedes</i>	<i>aegypti</i>	hembra	05/04/2015	Morfología	Adulto	RNA	42.162	2.143	
05/04/2015	2015	lluvia	Esmeraldas	16	16	1	-	-	<i>Aedes</i>	<i>aegypti</i>	hembra	05/04/2015	Morfología	Adulto	RNA	57.918	2.134	
05/04/2015	2015	lluvia	Esmeraldas	17	17	1	79,64626	0,9461	<i>Aedes</i>	<i>aegypti</i>	hembra	05/04/2015	Morfología	Adulto	RNA	126.265	1.381	DEN2 (ALIMENTADA)
05/05/2015	2015	lluvia	Esmeraldas	25	25	1	79,64467	0,94772	<i>Aedes</i>	<i>aegypti</i>	hembra	05/05/2015	Morfología	Adulto	RNA	107.244	2.008	DEN2
05/05/2015	2015	lluvia	Esmeraldas	25	25	1	79,64467	0,94772	<i>Aedes</i>	<i>aegypti</i>	hembra	05/05/2015	Morfología	Adulto	RNA	120.414	1,5	DEN1 (ALIMENTADA)
05/05/2015	2015	lluvia	Esmeraldas	26	26	1	-	-	<i>Aedes</i>	<i>aegypti</i>	hembra	05/05/2015	Morfología	Adulto	RNA	47.841	2.034	
05/05/2015	2015	lluvia	Esmeraldas	26	26	1	-	-	<i>Aedes</i>	<i>aegypti</i>	hembra	05/05/2015	Morfología	Adulto	RNA	113.077	2.075	
05/05/2015	2015	lluvia	Esmeraldas	27	27	1	-	-	<i>Aedes</i>	<i>aegypti</i>	hembra	05/05/2015	Morfología	Adulto	RNA	157.433	2.047	
05/05/2015	2015	lluvia	Esmeraldas	28	28	1	-	-	<i>Aedes</i>	<i>aegypti</i>	hembra	05/05/2015	Morfología	Adulto	RNA	82.153	2.183	
05/06/2015	2015	lluvia	Esmeraldas	30	30	1	-	-	<i>Aedes</i>	<i>aegypti</i>	hembra	05/06/2015	Morfología	Adulto	RNA	88.265	2.047	
05/06/2015	2015	lluvia	Esmeraldas	32	32	1	-	-	<i>Aedes</i>	<i>aegypti</i>	hembra	05/06/2015	Morfología	Adulto	RNA	126.786	2.032	
05/06/2015	2015	lluvia	Esmeraldas	35	35	1	-	-	<i>Aedes</i>	<i>aegypti</i>	hembra	05/06/2015	Morfología	Adulto	RNA	53.112	2.079	

05/06/2015	2015	lluvia	Esmeraldas	41	41	1	-	-	<i>Aedes</i>	<i>aegypti</i>	hembra	05/06/2015	Morfología	Adulto	RNA	86,27	2.196	
05/06/2015	2015	lluvia	Esmeraldas	42	42	1	79,64501	0,94808	<i>Aedes</i>	<i>aegypti</i>	hembra	05/06/2015	Morfología	Adulto	RNA	54,8	2,177	
05/06/2015	2015	lluvia	Esmeraldas	42	42	1	79,64501	0,94808	<i>Aedes</i>	<i>aegypti</i>	hembra	05/06/2015	Morfología	Adulto	RNA	123.402	2,054	DEN2
05/07/2015	2015	lluvia	Esmeraldas	47	47	1	-	-	<i>Aedes</i>	<i>aegypti</i>	hembra	05/07/2015	Morfología	Adulto	RNA	141.956	2.141	
05/07/2015	2015	lluvia	Esmeraldas	94	94	1	-	-	<i>Aedes</i>	<i>aegypti</i>	hembra	05/07/2015	Morfología	Adulto	RNA	97.016	2.078	
05/07/2015	2015	lluvia	Esmeraldas	113	113	1	79,3863	0,956921	<i>Aedes</i>	<i>aegypti</i>	hembra	05/07/2015	Morfología	Adulto	RNA	122.971	2.104	
05/07/2015	2015	lluvia	Esmeraldas	113	113	1	79,3863	0,956921	<i>Aedes</i>	<i>aegypti</i>	hembra	05/07/2015	Morfología	Adulto	RNA	48.701	1.622	
05/07/2015	2015	lluvia	Esmeraldas	113	113	1	79,3863	0,956921	<i>Aedes</i>	<i>aegypti</i>	hembra	05/07/2015	Morfología	Adulto	RNA	57.393	2.323	DEN1
05/07/2015	2015	lluvia	Esmeraldas	116	116	1	-	-	<i>Aedes</i>	<i>aegypti</i>	hembra	05/07/2015	Morfología	Adulto	RNA	208,45	2.161	
05/07/2015	2015	lluvia	Esmeraldas	121	121	1	-	-	<i>Aedes</i>	<i>aegypti</i>	hembra	05/07/2015	Morfología	Adulto	RNA	27.772	2.226	
05/08/2015	2015	lluvia	Esmeraldas	125	125	1	-	-	<i>Aedes</i>	<i>aegypti</i>	hembra	05/08/2015	Morfología	Adulto	RNA	121.347	2.182	
05/08/2015	2015	lluvia	Esmeraldas	125	125	1	-	-	<i>Aedes</i>	<i>aegypti</i>	hembra	05/08/2015	Morfología	Adulto	RNA	406.935	2.196	
05/08/2015	2015	lluvia	Esmeraldas	151	151	1	-	-	<i>Aedes</i>	<i>aegypti</i>	hembra	05/08/2015	Morfología	Adulto	RNA	119.385	2.092	
05/08/2015	2015	lluvia	Esmeraldas	151	151	1	-	-	<i>Aedes</i>	<i>aegypti</i>	hembra	05/08/2015	Morfología	Adulto	RNA	47.436	2.208	
05/08/2015	2015	lluvia	Esmeraldas	151	151	1	-	-	<i>Aedes</i>	<i>aegypti</i>	hembra	05/08/2015	Morfología	Adulto	RNA	47,59	1.983	

05/08/2015	2015	lluvia	Esmeraldas	151	151	1	-	-	<i>Aedes</i>	<i>aegypti</i>	hembra	05/08/2015	Morfología	Adulto	RNA	68.155	2,06	
05/08/2015	2015	lluvia	Esmeraldas	151	151	1	-	-	<i>Aedes</i>	<i>aegypti</i>	hembra	05/08/2015	Morfología	Adulto	RNA	20.698	2.217	
05/08/2015	2015	lluvia	Esmeraldas	151	151	1	-	-	<i>Aedes</i>	<i>aegypti</i>	hembra	05/08/2015	Morfología	Adulto	RNA	18.267	2.143	
05/08/2015	2015	lluvia	Esmeraldas	157	157	1	-	-	<i>Aedes</i>	<i>aegypti</i>	hembra	05/08/2015	Morfología	Adulto	RNA	109.761	2,01	
05/08/2015	2015	lluvia	Esmeraldas	157	157	1	-	-	<i>Aedes</i>	<i>aegypti</i>	hembra	05/08/2015	Morfología	Adulto	RNA	136.382	2.119	
05/08/2015	2015	lluvia	Esmeraldas	157	157	1	-	-	<i>Aedes</i>	<i>aegypti</i>	hembra	05/08/2015	Morfología	Adulto	RNA	208.798	2,21	
05/08/2015	2015	lluvia	Esmeraldas	157	157	1	-	-	<i>Aedes</i>	<i>aegypti</i>	hembra	05/08/2015	Morfología	Adulto	RNA	154.159	2.141	
05/08/2015	2015	lluvia	Esmeraldas	157	157	1	-	-	<i>Aedes</i>	<i>aegypti</i>	hembra	05/08/2015	Morfología	Adulto	RNA	62.107	2.096	
05/08/2015	2015	lluvia	Esmeraldas	157	157	1	-	-	<i>Aedes</i>	<i>aegypti</i>	hembra	05/08/2015	Morfología	Adulto	RNA	96.185	2.061	
05/08/2015	2015	lluvia	Esmeraldas	157	157	1	-	-	<i>Aedes</i>	<i>aegypti</i>	hembra	05/08/2015	Morfología	Adulto	RNA	213.232	2,22	
05/08/2015	2015	lluvia	Esmeraldas	157	157	1	-	-	<i>Aedes</i>	<i>aegypti</i>	hembra	05/08/2015	Morfología	Adulto	RNA	87.342	2.149	
05/08/2015	2015	lluvia	Esmeraldas	157	157	1	-	-	<i>Aedes</i>	<i>aegypti</i>	hembra	05/08/2015	Morfología	Adulto	RNA	78.979	2.143	
05/08/2015	2015	lluvia	Esmeraldas	159	159	1	-	-	<i>Aedes</i>	<i>aegypti</i>	hembra	05/08/2015	Morfología	Adulto	RNA	93.781	1.553	
05/08/2015	2015	lluvia	Esmeraldas	164	164	1	-	-	<i>Aedes</i>	<i>aegypti</i>	hembra	05/08/2015	Morfología	Adulto	RNA	129.202	0,911	
05/08/2015	2015	lluvia	Esmeraldas	165	165	1	-	-	<i>Aedes</i>	<i>aegypti</i>	hembra	05/08/2015	Morfología	Adulto	RNA	77.279	2.087	

05/08/2015	2015	lluvia	Esmeraldas	165	165	1	-	-	<i>Aedes</i>	<i>aegypti</i>	hembra	05/08/2015	Morfología	Adulto	RNA	213.042	2.104	
05/08/2015	2015	lluvia	Esmeraldas	176	176	1	79,64543	0,95349	<i>Aedes</i>	<i>aegypti</i>	hembra	05/08/2015	Morfología	Adulto	RNA	126.786	2.203	
05/08/2015	2015	lluvia	Esmeraldas	176	176	1	79,64543	0,95349	<i>Aedes</i>	<i>aegypti</i>	hembra	05/08/2015	Morfología	Adulto	RNA	132.442	2.224	DEN1
26/12/14	2014	lluvia	Esmeraldas	1	1	1	-	-	<i>Aedes</i>	<i>aegypti</i>	hembra	26/12/14	Morfología	Adulto	RNA	249,95	2.194	
26/12/14	2014	lluvia	Esmeraldas	2	2	1	-	-	<i>Aedes</i>	<i>aegypti</i>	hembra	26/12/14	Morfología	Adulto	RNA	75.739	2.149	DEN2
26/12/14	2014	lluvia	Esmeraldas	3	3	1	-	-	<i>Aedes</i>	<i>aegypti</i>	hembra	26/12/14	Morfología	Adulto	RNA	104.006	2.197	
27/12/14	2014	lluvia	Esmeraldas	4	4	1	-	-	<i>Aedes</i>	<i>aegypti</i>	hembra	27/12/14	Morfología	Adulto	RNA	152.037	1.884	
27/12/14	2014	lluvia	Esmeraldas	5	5	1	-	-	<i>Aedes</i>	<i>aegypti</i>	hembra	27/12/14	Morfología	Adulto	RNA	62.906	2.067	
27/12/14	2014	lluvia	Esmeraldas	6	6	1	-	-	<i>Aedes</i>	<i>aegypti</i>	hembra	27/12/14	Morfología	Adulto	RNA	63.192	2.151	
28/12/14	2014	lluvia	Esmeraldas	7	7	1	-	-	<i>Aedes</i>	<i>aegypti</i>	hembra	28/12/14	Morfología	Adulto	RNA	88,7	2.168	
28/12/14	2014	lluvia	Esmeraldas	8	8	1	-	-	<i>Aedes</i>	<i>aegypti</i>	hembra	28/12/14	Morfología	Adulto	RNA	84.581	2,2	
28/12/14	2014	lluvia	Esmeraldas	9	9	1	-	-	<i>Aedes</i>	<i>aegypti</i>	hembra	28/12/14	Morfología	Adulto	RNA	162.579	2.144	
28/12/14	2014	lluvia	Esmeraldas	10	10	1	-	-	<i>Aedes</i>	<i>aegypti</i>	hembra	28/12/14	Morfología	Adulto	RNA	37.828	1.898	

Anexo D: Base de datos de las muestras colectadas en Nueva Loja

Fecha Colecta	Año Colecta	Época	Localidad	Nmr_Csa	Nmr_Mst	cantidad de hembras	Coordenada_X	Coordenada_Y	Género	especie	Sexo	Fecha_Identificación	Método_Identificación (Col23)	Estadio_Vida	DNA/RNA	ng/μL	260/208	SEROTIPO
25/8/14	2014	Lluvia	Nueva Loja	8	8	1	76,51433	0,5809	<i>Aedes</i>	<i>aegypti</i>	hembra	25/8/14	Morfología	Adulto	RNA	114.309	2.219	
25/8/14	2014	Lluvia	Nueva Loja	14	14	1	76,51352	0,5758	<i>Aedes</i>	<i>aegypti</i>	hembra	25/8/14	Morfología	Adulto	RNA	131.227	2,16	
25/8/14	2014	Lluvia	Nueva Loja	16	16	1	76,51334	0,5759	<i>Aedes</i>	<i>aegypti</i>	hembra	25/8/14	Morfología	Adulto	RNA	104.411	2.186	
25/8/14	2014	Lluvia	Nueva Loja	17	17	1	76,51318	0,5751	<i>Aedes</i>	<i>aegypti</i>	hembra	25/8/14	Morfología	Adulto	RNA	115.957	2.014	DEN1(ALIMENTADA)
25/8/14	2014	Lluvia	Nueva Loja	18	18	1	76,52766	0,526	<i>Aedes</i>	<i>aegypti</i>	hembra	25/8/14	Morfología	Adulto	RNA	78.096	1,8110	DEN1
25/8/14	2014	Lluvia	Nueva Loja	18	18	1	76,52766	0,526	<i>Aedes</i>	<i>aegypti</i>	hembra	25/8/14	Morfología	Adulto	RNA	116.907	1,946	
25/8/14	2014	Lluvia	Nueva Loja	18	18	1	76,52766	0,526	<i>Aedes</i>	<i>aegypti</i>	hembra	25/8/14	Morfología	Adulto	RNA	64.935	1,905	
26/8/14	2014	Lluvia	Nueva Loja	19	19	1	76,52766	0,5258	<i>Aedes</i>	<i>aegypti</i>	hembra	26/8/14	Morfología	Adulto	RNA	99.014	2,067	
26/8/14	2014	Lluvia	Nueva Loja	19	19	1	76,52766	0,5258	<i>Aedes</i>	<i>aegypti</i>	hembra	26/8/14	Morfología	Adulto	RNA	104.496	2,064	
26/8/14	2014	Lluvia	Nueva Loja	20	20	1	76,52743	0,5248	<i>Aedes</i>	<i>aegypti</i>	hembra	26/8/14	Morfología	Adulto	RNA	162.687	2,246	
26/8/14	2014	Lluvia	Nueva Loja	21	21	1	76,52734	0,526	<i>Aedes</i>	<i>aegypti</i>	hembra	26/8/14	Morfología	Adulto	RNA	85.952	2,058	
26/8/14	2014	Lluvia	Nueva Loja	21	21	1	76,52734	0,526	<i>Aedes</i>	<i>aegypti</i>	hembra	26/8/14	Morfología	Adulto	RNA	61.013	2,113	DEN1 Y DEN3
26/8/14	2014	Lluvia	Nueva Loja	22	22	1	76,52712	0,5249	<i>Aedes</i>	<i>aegypti</i>	hembra	26/8/14	Morfología	Adulto	RNA	104.129	1,969	

26/8/14	2014	Lluvia	Nueva Loja	22	22	1	76,52712	0,5249	<i>Aedes</i>	<i>aegypti</i>	hembra	26/8/14	Morfología	Adulto	RNA	130.682	2,077	
27/8/14	2014	Lluvia	Nueva Loja	23	23	1	76,52777	0,5318	<i>Aedes</i>	<i>aegypti</i>	hembra	27/8/14	Morfología	Adulto	RNA	203.663	2,162	
27/8/14	2014	Lluvia	Nueva Loja	23	23	1	76,52777	0,5318	<i>Aedes</i>	<i>aegypti</i>	hembra	27/8/14	Morfología	Adulto	RNA	166.869	1,661	
27/8/14	2014	Lluvia	Nueva Loja	23	23	1	76,52777	0,5318	<i>Aedes</i>	<i>aegypti</i>	hembra	27/8/14	Morfología	Adulto	RNA	112.505	2.138	
27/8/14	2014	Lluvia	Nueva Loja	23	23	1	76,52777	0,5318	<i>Aedes</i>	<i>aegypti</i>	hembra	27/8/14	Morfología	Adulto	RNA	237.584	2,154	
27/8/14	2014	Lluvia	Nueva Loja	23	23	1	76,52777	0,5318	<i>Aedes</i>	<i>aegypti</i>	hembra	27/8/14	Morfología	Adulto	RNA	59.386	2,147	
27/8/14	2014	Lluvia	Nueva Loja	24	24	1	76,52764	0,532	<i>Aedes</i>	<i>aegypti</i>	hembra	27/8/14	Morfología	Adulto	RNA	254.922	2,211	
27/8/14	2014	Lluvia	Nueva Loja	24	24	1	76,52764	0,532	<i>Aedes</i>	<i>aegypti</i>	hembra	27/8/14	Morfología	Adulto	RNA	189.123	2,138	
27/8/14	2014	Lluvia	Nueva Loja	24	24	1	76,52764	0,532	<i>Aedes</i>	<i>aegypti</i>	hembra	27/8/14	Morfología	Adulto	RNA	165.828	2,191	
27/8/14	2014	Lluvia	Nueva Loja	25	25	1	76,5276	0,5324	<i>Aedes</i>	<i>aegypti</i>	hembra	27/8/14	Morfología	Adulto	RNA	125.557	2.013	
27/8/14	2014	Lluvia	Nueva Loja	25	25	1	76,5276	0,5324	<i>Aedes</i>	<i>aegypti</i>	hembra	27/8/14	Morfología	Adulto	RNA	106.839	2,095	
28/8/14	2014	Lluvia	Nueva Loja	26	26	1	76,52552	0,5325	<i>Aedes</i>	<i>aegypti</i>	hembra	28/8/14	Morfología	Adulto	RNA	88.384	2,137	
28/8/14	2014	Lluvia	Nueva Loja	26	26	1	76,52552	0,5325	<i>Aedes</i>	<i>aegypti</i>	hembra	28/8/14	Morfología	Adulto	RNA	173.276	2,130	
28/8/14	2014	Lluvia	Nueva Loja	27	27	1	76,5274	0,5326	<i>Aedes</i>	<i>aegypti</i>	hembra	28/8/14	Morfología	Adulto	RNA	159.123	2,042	
28/8/14	2014	Lluvia	Nueva Loja	28	28	1	76,52745	0,5331	<i>Aedes</i>	<i>aegypti</i>	hembra	28/8/14	Morfología	Adulto	RNA	168.019	2,179	

28/8/14	2014	Lluvia	Nueva Loja	28	28	1	76,52745	0,5331	<i>Aedes</i>	<i>aegypti</i>	hembra	28/8/14	Morfología	Adulto	RNA	57.959	1,895	
28/8/14	2014	Lluvia	Nueva Loja	28	28	1	76,52745	0,5331	<i>Aedes</i>	<i>aegypti</i>	hembra	28/8/14	Morfología	Adulto	RNA	90.725	2	
25/05/15	2015	Lluvia	Nueva Loja	6	6	1	-	-	<i>Aedes</i>	<i>aegypti</i>	hembra	25/05/15	Morfología	Adulto	RNA	165,52	2,176	
25/05/15	2015	Lluvia	Nueva Loja	34	34	1	-	-	<i>Aedes</i>	<i>aegypti</i>	hembra	25/05/15	Morfología	Adulto	RNA	127,883	2,194	
25/05/15	2015	Lluvia	Nueva Loja	34	34	1	-	-	<i>Aedes</i>	<i>aegypti</i>	hembra	25/05/15	Morfología	Adulto	RNA	49,463	2,179	
25/05/15	2015	Lluvia	Nueva Loja	34	34	1	-	-	<i>Aedes</i>	<i>aegypti</i>	hembra	25/05/15	Morfología	Adulto	RNA	5,666	1,75	
25/05/15	2015	Lluvia	Nueva Loja	34	34	1	-	-	<i>Aedes</i>	<i>aegypti</i>	hembra	25/05/15	Morfología	Adulto	RNA	131,36	2,16	
25/05/15	2015	Lluvia	Nueva Loja	34	34	1	-	-	<i>Aedes</i>	<i>aegypti</i>	hembra	25/05/15	Morfología	Adulto	RNA	168,395	2,156	
25/05/15	2015	Lluvia	Nueva Loja	34	34	1	-	-	<i>Aedes</i>	<i>aegypti</i>	hembra	25/05/15	Morfología	Adulto	RNA	206,365	1,48	
25/05/15	2015	Lluvia	Nueva Loja	37	37	1	-	-	<i>Aedes</i>	<i>aegypti</i>	hembra	25/05/15	Morfología	Adulto	RNA	54,634	1,421	DEN 2(ALIMENTADA)
25/05/15	2015	Lluvia	Nueva Loja	37	37	1	-	-	<i>Aedes</i>	<i>aegypti</i>	hembra	25/05/15	Morfología	Adulto	RNA	180,418	2,129	DEN3(ALIMENTADA)
25/05/15	2015	Lluvia	Nueva Loja	39	39	1	-	-	<i>Aedes</i>	<i>aegypti</i>	hembra	25/05/15	Morfología	Adulto	RNA	51,801	0,877	
25/05/15	2015	Lluvia	Nueva Loja	39	39	1	-	-	<i>Aedes</i>	<i>aegypti</i>	hembra	25/05/15	Morfología	Adulto	RNA	128,117	2,052	
25/05/15	2015	Lluvia	Nueva Loja	40	40	1	-	-	<i>Aedes</i>	<i>aegypti</i>	hembra	25/05/15	Morfología	Adulto	RNA	102,388	2,2	
25/05/15	2015	Lluvia	Nueva Loja	40	40	1	-	-	<i>Aedes</i>	<i>aegypti</i>	hembra	25/05/15	Morfología	Adulto	RNA	3,649	1,286	

25/05/15	2015	Lluvia	Nueva Loja	40	40	1	-	-	<i>Aedes</i>	<i>aegypti</i>	hembra	25/05/15	Morfología	Adulto	RNA	13,423	1,941	
25/05/15	2015	Lluvia	Nueva Loja	40	40	1	-	-	<i>Aedes</i>	<i>aegypti</i>	hembra	25/05/15	Morfología	Adulto	RNA	161,153	2,057	
25/05/15	2015	Lluvia	Nueva Loja	41	41	1	-	-	<i>Aedes</i>	<i>aegypti</i>	hembra	25/05/15	Morfología	Adulto	RNA	98,341	2,025	
25/05/15	2015	Lluvia	Nueva Loja	41	41	1	-	-	<i>Aedes</i>	<i>aegypti</i>	hembra	25/05/15	Morfología	Adulto	RNA	192,581	2,102	
25/05/15	2015	Lluvia	Nueva Loja	41	41	1	-	-	<i>Aedes</i>	<i>aegypti</i>	hembra	25/05/15	Morfología	Adulto	RNA	147,651	2,187	
25/05/15	2015	Lluvia	Nueva Loja	41	41	1	-	-	<i>Aedes</i>	<i>aegypti</i>	hembra	25/05/15	Morfología	Adulto	RNA	66,978	2,012	
25/05/15	2015	Lluvia	Nueva Loja	41	41	1	-	-	<i>Aedes</i>	<i>aegypti</i>	hembra	25/05/15	Morfología	Adulto	RNA	67,776	2,087	DEN3
26/05/15	2015	Lluvia	Nueva Loja	42	42	1	-	-	<i>Aedes</i>	<i>aegypti</i>	hembra	26/05/15	Morfología	Adulto	RNA	102,908	2,48	
26/05/15	2015	Lluvia	Nueva Loja	42	42	1	-	-	<i>Aedes</i>	<i>aegypti</i>	hembra	26/05/15	Morfología	Adulto	RNA	145,728	2,087	
26/05/15	2015	Lluvia	Nueva Loja	42	42	1	-	-	<i>Aedes</i>	<i>aegypti</i>	hembra	26/05/15	Morfología	Adulto	RNA	5,276	1,625	
26/05/15	2015	Lluvia	Nueva Loja	44	44	1	-	-	<i>Aedes</i>	<i>aegypti</i>	hembra	26/05/15	Morfología	Adulto	RNA	43,707	2,077	
26/05/15	2015	Lluvia	Nueva Loja	45	45	1	-	-	<i>Aedes</i>	<i>aegypti</i>	hembra	26/05/15	Morfología	Adulto	RNA	42,614	1,981	
26/05/15	2015	Lluvia	Nueva Loja	54	54	1	-	-	<i>Aedes</i>	<i>aegypti</i>	hembra	26/05/15	Morfología	Adulto	RNA	244,368	2,135	
26/05/15	2015	Lluvia	Nueva Loja	54	54	1	-	-	<i>Aedes</i>	<i>aegypti</i>	hembra	26/05/15	Morfología	Adulto	RNA	210,227	2,039	
26/05/15	2015	Lluvia	Nueva Loja	54	54	1	-	-	<i>Aedes</i>	<i>aegypti</i>	hembra	26/05/15	Morfología	Adulto	RNA	125,455	2,153	

26/05/15	2015	Lluvia	Nueva Loja	54	54	1	-	-	<i>Aedes</i>	<i>aegypti</i>	hembra	26/05/15	Morfología	Adulto	RNA	60,815	1,63	
26/05/15	2015	Lluvia	Nueva Loja	54	54	1	-	-	<i>Aedes</i>	<i>aegypti</i>	hembra	26/05/15	Morfología	Adulto	RNA	112,264	2,226	
26/05/15	2015	Lluvia	Nueva Loja	54	54	1	-	-	<i>Aedes</i>	<i>aegypti</i>	hembra	26/05/15	Morfología	Adulto	RNA	138,827	1,943	
26/05/15	2015	Lluvia	Nueva Loja	54	54	1	-	-	<i>Aedes</i>	<i>aegypti</i>	hembra	26/05/15	Morfología	Adulto	RNA	262,175	2,197	
26/05/15	2015	Lluvia	Nueva Loja	54	54	1	-	-	<i>Aedes</i>	<i>aegypti</i>	hembra	26/05/15	Morfología	Adulto	RNA	89,279	2,113	
27/05/15	2015	Lluvia	Nueva Loja	55	55	1	-	-	<i>Aedes</i>	<i>aegypti</i>	hembra	27/05/15	Morfología	Adulto	RNA	146,431	1,957	
27/05/15	2015	Lluvia	Nueva Loja	55	55	1	-	-	<i>Aedes</i>	<i>aegypti</i>	hembra	27/05/15	Morfología	Adulto	RNA	189,974	2,147	
27/05/15	2015	Lluvia	Nueva Loja	55	55	1	-	-	<i>Aedes</i>	<i>aegypti</i>	hembra	27/05/15	Morfología	Adulto	RNA	159,903	2,189	
27/05/15	2015	Lluvia	Nueva Loja	59	59	1	-	-	<i>Aedes</i>	<i>aegypti</i>	hembra	27/05/15	Morfología	Adulto	RNA	170,022	1,907	
27/05/15	2015	Lluvia	Nueva Loja	59	59	1	-	-	<i>Aedes</i>	<i>aegypti</i>	hembra	27/05/15	Morfología	Adulto	RNA	97,422	2,187	
27/05/15	2015	Lluvia	Nueva Loja	59	59	1	-	-	<i>Aedes</i>	<i>aegypti</i>	hembra	27/05/15	Morfología	Adulto	RNA	128,247	2,164	
27/05/15	2015	Lluvia	Nueva Loja	62	62	1	-	-	<i>Aedes</i>	<i>aegypti</i>	hembra	27/05/15	Morfología	Adulto	RNA	327,258	2,208	
27/05/15	2015	Lluvia	Nueva Loja	62	62	1	-	-	<i>Aedes</i>	<i>aegypti</i>	hembra	27/05/15	Morfología	Adulto	RNA	204,775	2,126	
27/05/15	2015	Lluvia	Nueva Loja	62	62	1	-	-	<i>Aedes</i>	<i>aegypti</i>	hembra	27/05/15	Morfología	Adulto	RNA	99,736	1,482	
27/05/15	2015	Lluvia	Nueva Loja	62	62	1	-	-	<i>Aedes</i>	<i>aegypti</i>	hembra	27/05/15	Morfología	Adulto	RNA	34,981	2,048	

27/05/15	2015	Lluvia	Nueva Loja	62	62	1	-	-	<i>Aedes</i>	<i>aegypti</i>	hembra	27/05/15	Morfología	Adulto	RNA	202,151	2,165	
27/05/15	2015	Lluvia	Nueva Loja	62	62	1	-	-	<i>Aedes</i>	<i>aegypti</i>	hembra	27/05/15	Morfología	Adulto	RNA	293,831	2,034	
28/05/15	2015	Lluvia	Nueva Loja	67	67	1	-	-	<i>Aedes</i>	<i>aegypti</i>	hembra	28/05/15	Morfología	Adulto	RNA	125,686	1,994	
28/05/15	2015	Lluvia	Nueva Loja	73	73	1	-	-	<i>Aedes</i>	<i>aegypti</i>	hembra	28/05/15	Morfología	Adulto	RNA	94,06	1,758	
28/05/15	2015	Lluvia	Nueva Loja	73	73	1	-	-	<i>Aedes</i>	<i>aegypti</i>	hembra	28/05/15	Morfología	Adulto	RNA	139,109	2,221	
28/05/15	2015	Lluvia	Nueva Loja	73	73	1	-	-	<i>Aedes</i>	<i>aegypti</i>	hembra	28/05/15	Morfología	Adulto	RNA	224,071	2,173	
28/05/15	2015	Lluvia	Nueva Loja	78	78	1	-	-	<i>Aedes</i>	<i>aegypti</i>	hembra	28/05/15	Morfología	Adulto	RNA	168,46	1,912	
28/05/15	2015	Lluvia	Nueva Loja	78	78	1	-	-	<i>Aedes</i>	<i>aegypti</i>	hembra	28/05/15	Morfología	Adulto	RNA	24,756	2,103	

Nota: El color naranja representa las muestras positivas.