

UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA
SEDE QUITO

INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA DE LOS RECURSOS NATURALES

Trabajo de titulación previo a la obtención del título de:
INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA DE LOS RECURSOS NATURALES

TEMA:

**“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”**

AUTOR:

JORGE EDUARDO COBA CÁRDENAS

DIRECTORA:

GERMANIA MARGARITA KAROLYS GUTIÉRREZ

Quito, marzo de 2015

**DECLARATORIA DE RESPONSABILIDAD Y AUTORIZACIÓN DE USO
DEL TRABAJO DE TITULACIÓN**

Autorizo a la Universidad Politécnica Salesiana la publicación total o parcial de este trabajo de titulación y su reproducción sin fines de lucro.

Además, declaro que los conceptos y análisis desarrollados y las conclusiones del presente trabajo son de exclusiva responsabilidad del autor.

Quito, 16 de marzo de 2015

Jorge Eduardo Coba Cárdenas

C.I.: 1723477020

DEDICATORIA

A mis padres.

AGRADECIMIENTO

Quiero expresar mi agradecimiento al laboratorio de Entomología Médica del Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública (INSPI), en la persona de la Dra. Varsovia Cevallos, PhD, directora de los proyectos SATVEC y directora del presente estudio por su valiosa guía científica; al equipo de investigadores de los proyectos, por haberme permitido el uso de los laboratorios y por su valiosa guía durante todo el desarrollo de este trabajo; igualmente, al personal técnico del mencionado instituto por instruirme en el manejo y aplicación de las técnicas de análisis.

De igual manera mi agradecimiento a la Secretaría Nacional de Educación Superior, Ciencia, Tecnología e Innovación (SENESCYT) por el financiamiento y el soporte brindado para el desarrollo del proyecto SATVEC PIC-12-INH-002. A la Universidad de las Américas (UDLA), al Dr. Patricio Ponce PhD y a la Dra. Sara Cifuentes por su guía y apoyo en el transcurso del presente estudio, por permitirme el uso de los laboratorios de la institución y por proporcionarme los controles positivos empleados en el estudio.

Así mismo agradezco a mi directora de tesis, la Lic. Germania Karolys por la constante ayuda brindada durante el desarrollo del presente trabajo y a mis profesores de la Universidad Politécnica Salesiana por las directrices proporcionadas.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO 1: GENERALIDADES	3
1.1 Planteamiento del problema	3
1.2 Antecedentes	4
1.2.1 Historia y situación del dengue en el mundo y en América Latina	4
1.2.2 Historia y situación del dengue en Ecuador.....	6
1.3 Justificación.....	9
1.4 Objetivos	8
1.4.1 Objetivo general.....	8
1.4.2 Objetivos específicos	8
CAPÍTULO 2: MARCO TEÓRICO.....	9
2.1 La enfermedad del Dengue.....	9
2.1.1 Fases y Síntomas de la Enfermedad	9
2.1.2 Clasificación del dengue	11
2.2 El vector <i>Aedes aegypti</i>	12
2.3 El virus del dengue y su estructura.....	15
2.3.1 Ciclo viral	18
2.3.2 Entrada de la partícula viral	19
2.3.3 Traducción y replicación del RNA	20
2.3.4 Ensamblaje, maduración y liberación de la partícula viral	21
2.3.5 Transmisión vertical en el vector.....	22
CAPÍTULO 3: ÁREA DE ESTUDIO Y METODOLOGÍA.....	23
3.1 Delimitación del área geográfica.....	23
3.2 Captura de adultos de <i>Aedes aegypti</i> en campo y toma de datos georeferenciales.....	24

3.3	Identificación morfológica, selección y almacenamiento de individuos en campo.....	26
3.4	Serotipificación Molecular	27
3.4.1	Reacción en cadena de la polimerasa con Transcripción Inversa Multiplex	27
3.4.1.1	Estandarización	28
3.4.1.1.1	Extracción de RNA total	28
3.4.1.1.2	RT-PCR Multiplex	29
3.4.1.1.3	Electroforesis.....	32
3.5	Análisis estadístico de resultados	32
CAPÍTULO 4: RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....		34
4.1	Serotipificación Molecular	34
4.1.1	Reacción en cadena de la polimerasa con Transcripción Inversa Multiplex	34
4.1.1.1	Estandarización	34
4.1.1.1.1	RT-PCR Multiplex	34
4.1.1.1.2	Serotipificación del virus del dengue en <i>Aedes aegypti</i>	36
4.2	Análisis estadístico de resultados	40
4.2.1	Prevalencia del virus del dengue en el área de estudio.....	40
4.2.2	Distribución geoespacial de <i>Aedes aegypti</i> y el virus del dengue en el área de estudio	41
4.2.3	Análisis estadístico	46
4.3	Discusión	47
CONCLUSIONES		52
RECOMENDACIONES		54
SIGLAS Y ACRÓNIMOS		55
GLOSARIO		57
LISTA DE REFERENCIAS		59

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Secuencias de los cebadores empleados en el estudio	30
Tabla 2: Tamaños de fragmento y cebadores empleados en la amplificación.....	30
Tabla 3: Volúmenes y concentraciones empleados por reacción de mastermix	30
Tabla 4: Programa de RT-PCR Multiplex	31
Tabla 5: Resumen de resultados por mes de captura de <i>Aedes aegypti</i>	36
Tabla 6: Prevalencia del virus del dengue en el periodo de enero a abril de 2014	40
Tabla 7: Total de individuos positivos a cada serotipo del virus del dengue durante los meses de enero a abril de 2014	41
Tabla 8: Seroprevalencia del virus del dengue del virus del dengue durante los meses de enero a abril de 2014	41
Tabla 9: Resumen de resultados de los muestreos realizados en el área de estudio. .	41
Tabla 10: Porcentajes obtenidos a partir de los análisis de resultados con base en el número de viviendas	42

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Regiones del planeta donde la presencia del vector del dengue es constante durante todo el año.	5
Figura 2: Ciclo de vida desde huevo a adulto del vector <i>Aedes aegypti</i>	14
Figura 3: Estructura del virus del dengue	15
Figura 4: Organización de las proteínas estructurales y no estructurales en el genoma del virus del dengue y su función.....	17
Figura 5: Ciclo del virus del dengue y ubicación de cada suceso	18
Figura 6: Ciclo del virus del dengue en la célula.	19
Figura 7: Esquema del RNA genómico del virus del dengue y de la poliproteína sintetizada en la traducción.	20
Figura 8: Ubicación del área de muestreo en la ciudad de Santo Domingo de los Tsáchilas.....	23
Figura 9: Delimitación del área de muestreo	24
Figura 10: Aspirador entomológico de mochila empleado en los muestreos.	26
Figura 11: Rasgos principales para identificación morfológica del <i>Aedes aegypti</i> macho y hembra.	27
Figura 12: Gel de agarosa al 2%, ensayo de RT-PCR multiplex en gradiente de temperatura de annealing para controles positivos del virus del dengue	35
Figura 13: Gel de agarosa en 2%. Producto de estandarización de protocolo de RT-PCR multiplex con controles positivos de los cuatro serotipos del virus del dengue	36
Figura 14: Gel de agarosa al 2% con los controles positivos de los cuatro serotipos del virus del dengue, muestras correspondientes al mes de enero y control negativo	37
Figura 15: Geles de agarosa al 2% con los controles positivos de los cuatro serotipos del virus del dengue, muestras correspondientes al mes de febrero y controles negativos.	38
Figura 16: Gel agarosa al 2% con los controles positivos, muestras del mes de marzo de 2014 y control negativo.....	39
Figura 17: Gel agarosa al 2% con los controles positivos, muestras del mes de abril de 2014 y control negativo.....	39
Figura 18: Porcentajes de individuos positivos a la presencia del virus del dengue por mes.	43
Figura 19: Mapa del área de muestreo con los puntos de las viviendas que muestran presencia de <i>Aedes aegypti</i>	44

Figura 20: Mapa del área de muestreo con los puntos de las viviendas que muestran presencia del virus del dengue en el vector..... 45

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1: Estado de la Erradicación del <i>Aedes aegypti</i> en las Américas, OMS 1958	65
Anexo 2: Planilla de colección de individuos adultos en campo. Proyecto SATVEC	66
Anexo 3: Manual de procedimiento para el alineamiento de los cebadores D1, TS1, TS2, TS3 y DEN4, con los genomas de los cuatro serotipos del virus del dengue.	67
Anexo 4: Tabla de resultados de serotipificación del virus del dengue por individuo analizado.	77
Anexo 5: Mapas del área de estudio con los puntos geográficos de presencia de <i>Aedes aegypti</i>	79
Anexo 6: Mapas del área de estudio con puntos georeferenciales de presencia del virus del dengue.	81
Anexo 7: Extracción de RNA total a partir de individuos de <i>Aedes aegypti</i>	83
Anexo 8: Resultados del análisis de ANOVA en el software Minitab	85
Anexo 9: Tabla de individuos analizados por área de colecta	86

RESUMEN

El desarrollo del Sistema Nacional de Vigilancia y Alerta Temprana para el Control del Vector de Dengue y Fiebre Amarilla: SATVEC DENGUE PIC-12-INH-002, un proyecto del Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública (INSPI) y la Secretaría de Educación Superior, Ciencia, Tecnología e Innovación (SENESCYT); contempla como una de sus líneas de investigación a la identificación de los serotipos del virus del dengue presentes en la población de vectores *Aedes aegypti*.

El dengue, una enfermedad infecciosa que en Ecuador ha presentado un comportamiento endémico y epidémico desde su reemergencia a finales de 1988, pone en riesgo a cerca de 8 millones de personas que habitan en zonas tropicales y subtropicales del país que presentan deficiencias en cuanto a servicios básicos y sanitarios. El estudio se realizó en la Cooperativa de Vivienda Provincias Unidas ubicada en Santo Domingo de los Tsáchilas durante los meses de enero a abril de 2014, siguiendo los protocolos desarrollados por el proyecto. La fase de laboratorio se realizó tomando como referencia las metodologías utilizadas por Lanciotti *et al.*, 1992 y Harris *et al.*, 1998; las mismas que han sido adaptadas a las condiciones y a la disponibilidad de materiales y equipos en el laboratorio de Biología Molecular de Entomología Médica del INSPI-Quito.

Se aplicó la metodología de extracción de RNA total mediante el kit RNAqueous, a partir de individuos hembra de la especie *Aedes aegypti* capturadas en campo; posteriormente se realizaron ensayos para la estandarización de los programas de RT-PCR Multiplex, siguiendo los rangos establecidos por el fabricante del kit SuperScript® III One-Step RT-PCR System with Platinum® Taq DNA Polymerase.

Como resultados se identificaron tres serotipos del virus circulando en la población de vectores, de los cuales el DENV-2 fue el más prevalente en el tiempo; el análisis estadístico de ANOVA no demostró relación entre la presencia del virus del dengue con el mes de captura de las muestras ($p\text{-value}=0,114$) y la zona donde fueron colectadas ($p\text{-value}=0,08$).

Palabras clave: Dengue virus, RT-PCR Multiplex, *Aedes aegypti*, RNA viral, Sistema de Alerta de vectores

ABSTRACT

The development of the National Early Warning Surveillance and Control Vector of Dengue and Yellow Fever: DENGUE SATVEC PIC-12-INH-002, a cooperative project of the Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública (INSPI) and Secretaría de Educación Superior, Ciencia, Tecnología e Innovación (SENESCYT); includes as one of its fields of research to the identification of the serotypes of dengue virus presents in the population of *Aedes aegypti*.

Dengue is an infectious illness that in Ecuador has been represent an endemic and epidemic behavior since its reemergence at the end of 1988; about 8 million of people who living in tropical and subtropical areas of the country that have deficiencies in basic and health services, are currently at risk. The present study was realized in the Cooperativa de Vivienda Provincias Unidas located in Santo Domingo de los Tsáchilas during the months from January to April of 2014, following the protocols developed by the Project SATVEC Dengue. The laboratory phase was conducted with reference to the methodologies used by Lanciotti *et al.*, 1992 and Harris *et al.*, 1998 the same that have been adapted to the conditions and the availability of materials and equipment in the laboratory of Molecular Biology of Medical Entomology in INSPI-Quito.

Extraction methodology of total RNA was applied by micro RNAqueous kit from Ambion, from female individuals of the species *Aedes aegypti* field captured; then multiple tests were conducted to standardize programs of Multiplex RT-PCR, following the ranges established by the kit manufacturer Superscript III One-Step RT-PCR System with Platinum® Taq DNA Polymerase from Life technologies.

The results showed that the three serotypes of virus circulating in the vector population was identified; of which the DENV-2 was the most prevalent at the time; ANOVA statistical analysis showed no relationship between the presence of dengue virus with the month of capture of samples ($p\text{-value}=0,114$) and the area where they were collected ($p\text{-value}=0,08$).

Key words: Dengue virus, RT-PCR Multiplex, viral RNA, *Aedes aegypti*, Vector Warning System.

INTRODUCCIÓN

El dengue es una enfermedad infecciosa provocada por uno de los cuatro serotipos del virus del mismo nombre, que es transmitida al ser humano por la picadura de mosquitos infectados del género *Aedes*. En nuestro país el único vector identificado hasta la fecha es el mosquito de la especie *Aedes aegypti* que se encuentra presente en un 70% del territorio poniendo en riesgo a cerca de 8 millones de personas que habitan en las zonas tropicales y subtropicales; esto junto con variables socio-económicas tales como el limitado acceso a agua potable, alcantarillado, recolección de basura y otros servicios sanitarios básicos, conforman el ambiente adecuado para el desarrollo del insecto vector y en consecuencia de la aparición de epidemias de dengue en ciertas épocas del año desde finales de 1988, cuando se dio una reinfestación del país por el vector *Aedes aegypti*.

El Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública (INSPI) con auspicio de la Secretaría Nacional de Educación Superior, Ciencia, Tecnología e Innovación (SENESCYT), se encuentran desarrollando el proyecto de investigación titulado: Sistema Nacional de Vigilancia y Alerta Temprana para el control del vector de Dengue y Fiebre Amarilla (SATVEC DENGUE PIC-12-INH-002), que busca desarrollar un sistema que permita la prevención de brotes de la enfermedad. Dentro de sus líneas de investigación se encuentra la identificación de los serotipos del virus del dengue en las poblaciones de *Aedes aegypti* en diferentes localidades de alto riesgo epidemiológico del país.

En la actualidad, la disponibilidad y aplicabilidad de herramientas en investigación y análisis moleculares, nos permite realizar estudios a nivel genético con una cantidad limitada de material; esto nos abre la puerta a la realización de este estudio a nivel de individuo para el conocimiento más amplio del virus y sus serotipos en el organismo vector. La reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR) ha sido ampliamente utilizada para estudios de RNA con resultados satisfactorios, siendo empleada en la actualidad para muchos procesos de diagnóstico principalmente en enfermedades virales. La especificidad, rapidez y confiabilidad de los resultados obtenidos mediante esta metodología nos brindan un sustento científico para sentar las bases del presente estudio; el empleo de cebadores específicos para cada serotipo del

virus del dengue en una RT-PCR Multiplex, nos permite la identificación simultánea de cualquiera de los serotipos virales en un solo vial de reacción, con una pequeña cantidad de material genético, permitiendonos observar si existe co-infección con más de un serotipo en un individuo infectado.

CAPÍTULO 1

GENERALIDADES

1.1 Planteamiento del problema

El Dengue es una enfermedad infecciosa provocada por el virus del Dengue y es transmitido por la picadura de mosquitos infectados del género *Aedes*, principalmente el mosquito *Aedes aegypti* (Centers for Disease Control and Prevention, 2012) (Organización Mundial de la Salud, 2009) (Lobo, 2011, pág. 1).

En Ecuador la enfermedad ha presentado un comportamiento endémico y epidémico desde su reemergencia a finales del año 1988, desde entonces la enfermedad se ha propagado de manera progresiva en concordancia con la dispersión del mosquito vector y a la circulación de los serotipos virales registrados en los ciclos epidémicos (Ministerio de Salud Pública, 2013). Está ligada a componentes sociales, culturales, económicos y ambientales; ya que afecta principalmente a zonas que presentan deficiencias en materia de servicios básicos como agua, potable, alcantarillado, servicio recolector de basura y otros.; constituyendo así un entorno óptimo para el desarrollo del vector principalmente en la temporada lluviosa; poniendo en riesgo a la población que habita en las zonas de alto riesgo epidemiológico (Ministerio de Salud Pública, 2013).

El estudio de los serotipos virales del dengue que circulan en la población de *Aedes aegypti* de las diferentes localidades del país, es uno de los objetivos del proyecto para el desarrollo del sistema; la biotecnología que aplica las técnicas de estudio en biología molecular, junto con análisis estadísticos de los resultados obtenidos, permitirá determinar la circulación de los serotipos del virus en el mosquito vector y anticipar el riesgo de una epidemia.

1.2 Antecedentes

1.2.1 Historia y situación del dengue en el mundo y en América Latina

El término dengue proviene de la frase swahili: “*ka denga pepo*”, que señala un cuadro convulsivo con fuertes dolores y que es provocado por malos espíritus; a su vez corresponde al español para definir “afectación”, cuidado” o cauteloso” (Lobo, 2011, pág. 1) (Fajardo, 2011, pág. 8). Su origen es aún incierto, pero se ha propuesto que pudo originarse en los bosques asiáticos en un ciclo infeccioso que involucra primates y mosquitos (Lobo, 2011, pág. 2).

El registro posiblemente más antiguo que se tiene de la enfermedad del dengue, se encuentra en la Enciclopedia China de Síntomas de Enfermedades y Remedios publicado durante la dinastía Chin entre el año 265 a 420 a.C.; la enfermedad era llamada “veneno de agua” y se creía que estaba relacionada con insectos voladores asociados con el agua (Gubler, 1998, pág. 480). Para 1635 se reportaron epidemias con síntomas similares a la enfermedad del dengue en las Antillas Francesas y en Panamá en 1699. El tratamiento para la enfermedad propuesto por el Dr. José Sabater en 1771 consistía en pequeñas cantidades de ron; a la misma época la enfermedad fue llamada “fiebre rompe huesos” debido a los síntomas que manifestaban los infectados (Lobo, 2011, pág. 1). En el año de 1780 la epidemia más tarde conocida como “dengue” fue documentada por primera vez como “fiebre remitente biliosa”, en Filadelfia Pensilvania por el Dr. Benjamin Rush; los síntomas incluían fiebre, dolores en articulaciones, dolores musculares, dolor de cabeza, sarpullido, debilidad, náuseas, vómito y sangrado (Fajardo, 2011, pág. 11) (Lobo, 2011, pág. 1).

El dengue hemorrágico, actualmente conocido como “Dengue con signos de alarma”; fue descrito por primera vez en 1960, posterior a epidemias registradas en: Filipinas, Manila y Bangkok; aunque autores como Halstead y otros. en 1980 plantearon un estudio retrospectivo que indica un registro de la enfermedad en Grecia en 1928 con una alta tasa de mortandad (Kourí, 2006, pág. 143).

Entre 50 y 100 millones de personas son infectadas con el virus del dengue alrededor del mundo cada año; de estas un estimado de 500000 personas, principalmente niños, presentan el llamado “dengue grave”; en algunos países esta clase de dengue causa mortalidad en cerca del 5% de los pacientes (Lobo, 2011, pág. 1). Actualmente, un aproximado de 3 billones de personas alrededor del mundo que viven en las regiones

tropicales del sureste asiático, África, las Américas y el Pacífico se encuentran en riesgo de contraer la infección (Lobo, 2011, pág. 1), la amplia distribución del vector *Aedes aegypti* que se muestra en la figura 1, nos brinda una idea de la distribución de los 2,5 mil millones de personas que viven en países donde la enfermedad es endémica y está estrechamente relacionada con las condiciones económicas, sanitarias, socio-culturales y ambientales de la población. Los lugares con mayor susceptibilidad se encuentran en las áreas urbanas y periurbanas, aunque se han registrado casos en las zonas rurales; esto debido principalmente a la creciente expansión geográfica de las áreas urbanas a rurales.



En la región de las Américas, el dengue constituye una patología con más de 200 años de existencia; el primer antecedente data de un brote en Filadelfia en el año de 1780 (Amunárriz, Rios, Torres, & Solís, 2009, pág. 9).

En América Latina es reportada por primera vez una epidemia de dengue en el año de 1818 en Perú con cerca de 50000 casos; esta epidemia se convirtió en pandemia entre los años de 1824 a 1828. Posteriormente, entre 1827 y 1828 se registraron pandemias en la región del Caribe Golfo-Atlántico, el oeste de Cuba, Jamaica, Venezuela, y

Veracruz en México. De igual manera durante estos años se vieron afectados países como Curazao, las Antillas, Colombia y Bermudas con casos que presentaban hemorragias (Badii, Landeros, Cerna, & Abreu, 2007, pág. 249).

En Brasil se registraron casos por primera vez entre 1846 y 1848; En la década de 1850 se reportan en Cuba casos de la enfermedad con presencia de hemorragias y en 1851 en Lima. Para el siglo XX la enfermedad presenta casos en Cuba, Panamá (primer reporte de DENV-2 en la región en 1941), Colombia, Chile, Puerto Rico, Argentina, Brasil, Bahamas, México, Venezuela y Perú (Badii, Landeros, Cerna, & Abreu, 2007, pág. 258).

1.2.2 Historia y situación del dengue en Ecuador

En el caso de Ecuador, para el año de 1958, le es otorgado el certificado de erradicación de *Aedes aegypti*, vector del dengue, en la XXV Conferencia Sanitaria Panamericana, X Reunión del Comité Regional de la Organización Mundial de la Salud para las Américas (OPS); en la Resolución XXXV CSP15.R35 ES, a consecuencia de la “Campana continental de erradicación del *Aedes aegypti*” con la siguiente resolución (Anexo 1: Estado de la Erradicación del *Aedes aegypti* en las Américas, OMS 1958):

“Aceptar los informes presentados en los que se declara que Belice, Bolivia, Brasil, Ecuador, Guayana Francesa, Nicaragua, Panamá, Paraguay, Perú, Uruguay y Zona del Canal, han quedado libres de *Aedes aegypti*” (Organización Mundial de la Salud, 1958, pág. 53).

A pesar de los esfuerzos realizados y a las recomendaciones de la Organización Panamericana de la Salud (OPS) para lograr una vigilancia y control óptimos para la población de *Aedes aegypti* en los territorios declarados como libres del vector de dengue, en el año de 1975 se da una nueva infestación del mosquito, reportándose en 1988, cerca de 32 años después del último reporte, la primera epidemia de dengue posterior a la erradicación y presentando el serotipo del virus DENV-1 (Real, y otros, 2012), siendo este el primer reporte del serotipo en el Ecuador (Badii, Landeros, Cerna, & Abreu, 2007, pág. 261). Para 1990 se presenta un brote de la enfermedad en la ciudad de Guayaquil, con el serotipo DENV-2, genotipo americano.

Tres años después en 1993, se reporta por primera vez el serotipo DENV-4 presentándose hasta el año de 1999 una circulación simultánea de los tres serotipos en el país (Real, y otros, 2012, pág. 3). Finalmente en el año 2000, se reporta el primer caso de dengue causado por el serotipo DENV-3 y la introducción del genotipo asiático del DENV-2, observándose desde entonces un aumento de los casos de Dengue Hemorrágico (actualmente dengue con signos de alerta) (Badii, Landeros, Cerna, & Abreu, 2007, pág. 264). Así se registra la presencia de los cuatro serotipos del virus, circulantes en el país hasta últimos datos de los años 2012 y 2013 en los cuales no se ha registrado circulación del serotipo DENV-3 (Ministerio de Salud Pública, 2013).

El serotipo DENV-1 fue registrado entre los años de 1988 hasta 1999 en las provincias de Guayas, Manabí, el Oro, Loja, Esmeraldas, Sucumbíos, Chimborazo y Bolívar. A partir del mes de enero de 1990 se reporta la presencia del serotipo DENV-2 en Guayas, Manabí, El Oro y Bolívar. El serotipo DENV-4 es registrado desde el mes de febrero de 1992 en Guayas y El Oro.

Desde la introducción del serotipo DENV-2 en la ciudad de Guayaquil en 1990, hasta el año de 1999 se evidencia un alza en la incidencia del dengue; presentándose de manera endémica en Guayaquil y epidémica en diferentes zonas de la costa ecuatoriana, llegando a valles subtropicales de la sierra y a la Amazonía.

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo general

Determinar la prevalencia del virus del dengue y los serotipos presentes en hembras del mosquito *Aedes aegypti* capturados en la “Cooperativa de Vivienda Provincias Unidas” en la ciudad de Santo Domingo, Ecuador.

1.3.2 Objetivos específicos

Evaluar la distribución geoespacial de *Aedes aegypti* en el área de estudio.

Identificar los serotipos del virus del dengue que circulan en el área.

CAPÍTULO 2

MARCO TEÓRICO

2.1 La enfermedad del Dengue

El dengue es una enfermedad infecciosa reemergente endémico-epidémica de gran importancia a nivel mundial en términos de mortalidad, morbilidad e impacto económico (De la Mora, Jiménez, & Treviño, 2010, pág. 128); está presente en todas las regiones tropicales y subtropicales del planeta (Organización Mundial de la Salud, 2012) y es causada por el virus del dengue, un *flavivirus* transmitido por la picadura de mosquitos hembras infectados del género *Aedes*, principalmente el *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae) (Centers for Disease Control and Prevention, 2012) (Organización Mundial de la Salud, 2009, pág. 15) (Lobo, 2011, pág. 2). *Aedes aegypti* es un mosquito doméstico de aguas generalmente limpias, con comportamiento diurno y antropofílico (Ortega, 2001, pág. 43) que puede transmitir el virus después de un periodo de 8 a 12 días de incubación extrínseca posterior a la ingestión de sangre; en el ser humano la incubación varía desde 3 a 14 días siendo el promedio entre los 3 y 7 días (Gubler, 1998, pág. 484).

La enfermedad causada por cualquiera de los cuatro serotipos produce una sintomatología variada, que va desde una enfermedad febril leve a severa; hasta el cuadro hemorrágico mortal en función de los factores de riesgo tales como la cepa y serotipo del virus infectante, estado inmune, edad y antecedentes genéticos del paciente. En zonas consideradas como endémicas, la enfermedad suele ser inespecífica desde el punto de vista clínico, principalmente en los niños quienes presentan síntomas de un síndrome viral que son catalogados con una variedad de nombres de acuerdo a la región. (Gubler, 1998, pág. 484).

2.2 Justificación

El proyecto de investigación: “Sistema Nacional de Vigilancia y Alerta Temprana para el Vector de Dengue y Fiebre Amarilla: SATVEC DENGUE PIC-12-INH-002”, ejecutado por INSPI y SENESCYT contempla como uno de sus objetivos la identificación de los serotipos del virus en el mosquito *Aedes aegypti*.

Para el presente estudio se escogió a la provincia de Santo Domingo de los Tsáchilas, zona que presentó la mayor tasa de infectados por cada 100000 habitantes de dengue grave en el año 2012, con un total de 74 casos y una circulación del serotipo DENV-2 únicamente (Ministerio de Salud Pública, 2013). Por esta razón constituye una de las localidades de mayor interés para el estudio de la patología y su causa. La “Cooperativa de Vivienda Provincias Unidas”, es un barrio de reciente desarrollo urbano, agrupa los factores ecológicos propicios para el desarrollo del vector; siendo comprobada la presencia del mismo y la circulación del virus en la zona por reportes de pacientes infectados, por lo que se consideró un espacio geográfico idóneo para la realización del presente estudio.

2.2.1 Fases y síntomas de la enfermedad

El dengue presenta tres fases durante su ciclo: Fase febril, fase crítica y fase de recuperación o convalecencia (Organización Panamericana de la Salud, 2010, pág. 5) (Organización Mundial de la Salud, 2009, pág. 25).

La fase febril que se presenta entre los dos a siete días posteriores a la infección se caracteriza por síntomas como dolores de cabeza, de articulaciones, erupciones cutáneas, dolor corporal, falta de apetito y vómito; la reducción del número de glóbulos blancos pueden considerarse como un indicador de la presencia del virus del dengue (Organización Mundial de la Salud, 2009, pág. 26).

La siguiente fase de la enfermedad denominada como fase crítica se caracteriza por un descenso de la fiebre entre los tres a siete días de padecimiento; la extravasación del plasma y una disminución en el recuento de plaquetas puede dar lugar a un aumento de la permeabilidad capilar lo que significaría una mejoría del paciente, caso contrario la pérdida del volumen plasmático sería perjudicial para su estado presentándose el denominado estado de “choque” precedido por signos de alarma. Si este periodo es prolongado puede producir deterioro en varios órganos y sistemas.

El descenso de la fiebre puede dar lugar a la mejoría del paciente, lo que determinaría un dengue sin signos de alarma; un agravamiento de su estado por la presencia de signos de alarma que pueden ser controlados con rehidratación intravenosa. El dengue grave está determinado por el deterioro progresivo del estado del paciente por los signos de alarma (Organización Panamericana de la Salud, 2010, pág. 56).

La fase final de la enfermedad corresponde a la fase de recuperación o convalecencia y se da si el paciente ha sobrevivido a la fase crítica, la misma que no excede de 48 a 72 horas; se pueden evidenciar mejorías en el apetito, diuresis, número de plaquetas y glóbulos blancos (Acosta & Gómez, 2005, págs. 122-124) (Organización Mundial de la Salud, 2009, pág. 16).

2.2.2 Clasificación del dengue

Durante cerca de 30 años la Organización Mundial de la Salud (OMS) reconoció la clasificación del dengue como: fiebre del dengue (FD) y fiebre hemorrágica de dengue (FHD) con o sin síndrome de choque por dengue (SCD). Sin embargo al ser

dependiente de los resultados de laboratorio y no inclusiva con enfermos que presentan diferentes niveles de gravedad que manifestaban síntomas como encefalitis, miocarditis o hepatitis grave; se planteó un estudio llamado DENCO (Dengue control) que a partir del análisis de 2000 casos confirmados en siete países de dos continentes, concluyó que entre el 18% y 40% de los casos no podían ser categorizados dentro de la clasificación empleada; de igual manera más del 15% de los casos con shock no podían ser categorizados como “graves” (Ministerio de Salud. Argentina, 2013).

Como resultado del estudio se propuso una clasificación del dengue en función de los signos de alarma, condiciones pre-existentes, riesgo social y síntomas. De esta manera se plantea la enfermedad del dengue sin signos de alarma ni co-morbilidad, con co-morbilidad, con signos de alarma y dengue grave (Ministerio de Salud. Argentina, 2013).

El dengue con signos de alarma es aquel que presenta condiciones coexistentes como embarazo, niños, adultos mayores, obesidad, diabetes mellitus, cardiopatías y otras condiciones clínicas y de riesgo social como vivir solo, difícil acceso a un hospital, y pobreza extrema, que requieran una modificación del tratamiento; en este caso es necesario referir al paciente a un hospital (Acosta & Gómez, 2005, pág. 124) (Organización Panamericana de la Salud, 2010, pág. 26).

Los criterios para calificar un caso de dengue grave son uno o más de los siguientes:

- Choque hipovolémico por fuga de plasma
- Distres respiratorio por acumulación de líquidos
- Sangrado grave
- Daño orgánico importante

Bajo estas condiciones de análisis, la nueva clasificación tiene una sensibilidad del 95% y especificidad del 97% en los casos de dengue y sus manifestaciones (Ministerio de Salud. Argentina, 2013, pág. 12).

2.3 El vector *Aedes aegypti*

Aedes aegypti es un mosquito originario del cinturón tropical de África, donde se encuentran la mayoría de especies del subgénero *Stegomyia* (De la Mora, Jiménez, & Treviño, 2010, pág. 128); pertenece a la clase Insecta, orden Díptera, suborden

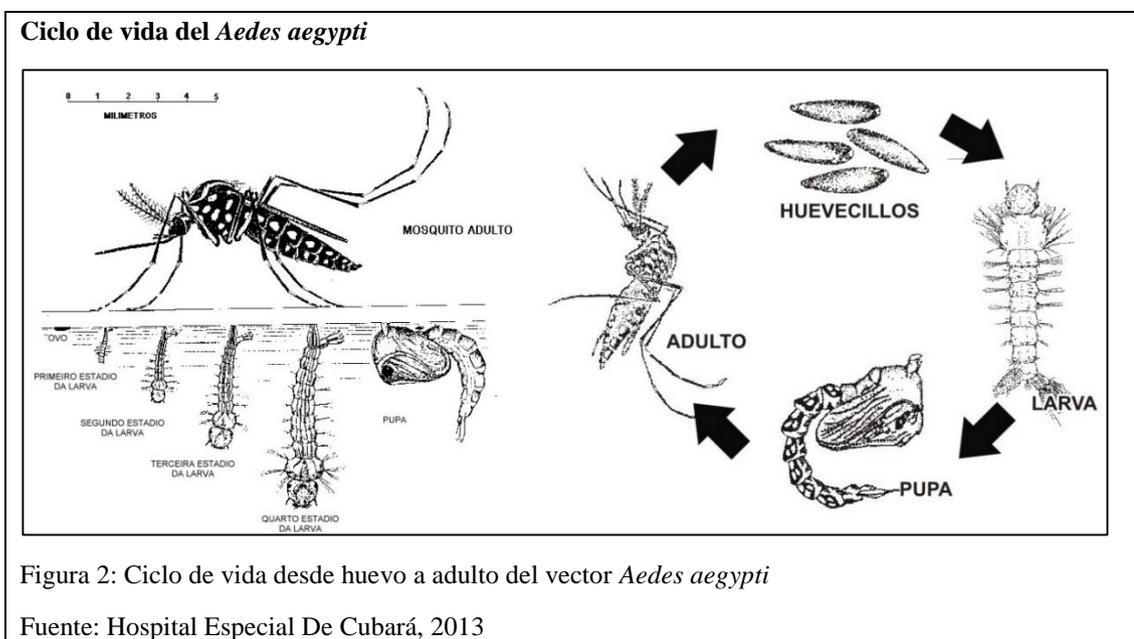
Nematocera y familia *Culicidae*; las hembras son hematófagas, se alimentan de sangre y puede ser transmisoras de enfermedades a humanos, aves, otros mamíferos, reptiles y anfibios; aunque puede llegar a alimentarse de sangre de peces, no puede transmitirles ninguna enfermedad (Thiri3n, 2003, p3g. 15). Es considerado como la especie de mayor importancia en salud p3blica debido a su amplia distribuci3n en las zonas tropicales y subtropicales del mundo; esto debido a factores como la migraci3n, deficiencia en la prestaci3n de servicios b3sicos, condiciones de las viviendas, pobreza y expansi3n urbana (De la Mora, Jim3nez, & Trevi3o, 2010, p3g. 128) (Ministerio de Salud P3blica, 2013) y por su capacidad de transmitir varias enfermedades arbovirales a los humanos como el dengue, la fiebre amarilla y el virus del Chikungunya. El mosquito posee h3bitos principalmente dom3sticos en 3reas urbanas y suburbanas aunque ha colonizado ciertas zonas en 3reas rurales (Thiri3n, 2003, p3g. 32) (Maquetti, 2008, p3gs. 12-14). Los lugares de cr3a de sus fases inmaduras se centran en las viviendas o sus alrededores, encontr3ndose tanto en contenedores artificiales como floreros, tanques, llantas, como tambi3n en criaderos naturales como c3scaras de frutos, huecos en 3rboles, axilas de plantas. (Thiri3n, 2003, p3g. 107).

El ciclo de vida del mosquito atraviesa cuatro fases que inician con la ovipostura cuya abundancia est3 en funci3n de la ingesta sangu3nea de la hembra; es vespertina y se da cerca de tres d3as despu3s de la alimentaci3n (Centers for Disease Control and Prevention, 2014). Los huevos miden cerca de un mil3metro de largo y son puestos uno a uno adheridos a las paredes del criadero. Esta fase dura entre 2 y 3 d3as y requiere de abundante humedad; en su interior se desarrolla la larva que puede permanecer en estado de diapausa por periodos de varios meses hasta un a3o (Thiri3n, 2003, p3g. 11) (Colvard, 1978, p3g. 23).

Cuando los contenedores o criaderos se han llenado con agua y la actividad bacteriana de la materia org3nica disuelta ha disminuido la tensi3n del ox3geno en el medio, el huevo eclosiona dando inicio a la fase acu3tica que comprende cuatro estadios larvales, donde la caracter3stica principal es la alimentaci3n de materia org3nica y su desarrollo (Nelson, 1986, p3g. 96) (Montero, 2009, p3g. 4). Con condiciones favorables de nutrici3n y temperatura (25°C-29°C), las etapas larvales pueden culminar al cabo de 5 a 7 d3as; la mortalidad m3s elevada se da en los primero estadios o a su vez en condiciones inestables (criaderos de peque3o tama3o o a la intemperie). Las larvas no

pueden tolerar temperaturas inferiores a 10°C y superiores a 42°C (Thirión, 2003, pág. 31) (Maquetti, 2008, pág. 17) (Montero, 2009, pág. 5).

Concluidas las etapas larvarias se da lugar al desarrollo de la pupa, un estadio donde no se requiere alimentación y cuyas condiciones óptimas se encuentran entre 28°C y 32°C (Thirión, 2003, pág. 31) donde se da lugar a modificaciones anatómicas y fisiológicas. Las pupas presentan un comportamiento activo, siendo sensibles a estímulos como la vibración. Posterior a un periodo comprendido entre 1 y 3 días del periodo de pupa, se produce la emergencia del adulto, el cual mantiene un reposo para lograr endurecimiento del exoesqueleto y las alas (Montero, 2009, pág. 5).



Un mosquito adulto de *Aedes aegypti*, tiene un tamaño de cerca de 5 milímetros de longitud, presenta un color negro con escamas plateadas formando un diseño de lira en el dorso del tórax y patas anilladas. Las hembras presentan una proboscis adaptada para la ingestión sanguínea, de igual manera presentan dimorfismo sexual al presentar palpos menos pilosos que los machos (figura 2). Las hembras pueden vivir hasta 50 días y tienen un rango de vuelo de hasta 150 metros de la vivienda humana (Ministerio de Salud El Salvador, 2000, pág. 1) (Thirión, 2003, pág. 23) (Gubler, 1998, pág. 485).

2.4 El virus del dengue y su estructura

El virus del dengue es un arbovirus (Arthropod-borne virus) perteneciente a la familia Flaviviridae y género *Flavivirus*, que comprende a un grupo de cuatro serotipos virales relacionados pero diferentes antigénicamente y serológicamente denominados: DENV-1, DENV-2, DENV-3 y DENV-4 (Mamani, 2013, pág. 13) (Velandia & Castellanos, 2011, pág. 33), con una homología del 70% entre ellos, principalmente en los serotipos 1, 2 y 3. Adicionalmente los serotipos pueden presentar variantes genéticas dentro de sí mismos (topotipos o genotipos) que están relacionados con su virulencia y origen geográfico (Cabezas, y otros, 2005, pág. 214). Como características físico-químicas del virión se conoce que muestra estabilidad a los tratamientos con sacarosa y a la conservación a -70°C . Puede sufrir alteraciones o ser inactivado por solventes como éter, cloroformo, formalina, detergentes, proteasas, radiación UV y ultrasonido (Montes, 2001).

La parte externa del virus está constituida por la nucleocápside que tiene una forma esférica de aproximadamente 30 nanómetros, derivada de la bicapa lipídica de la célula infectada. La nucleocápside cubre a la membrana lipídica, la misma que rodea la cápsula viral que es la encargada de la protección del ARN viral como se muestra en la figura 3 (Laredo, Guo, & Bocanegra, 2012, pág. 30).

Estructura del virus del dengue

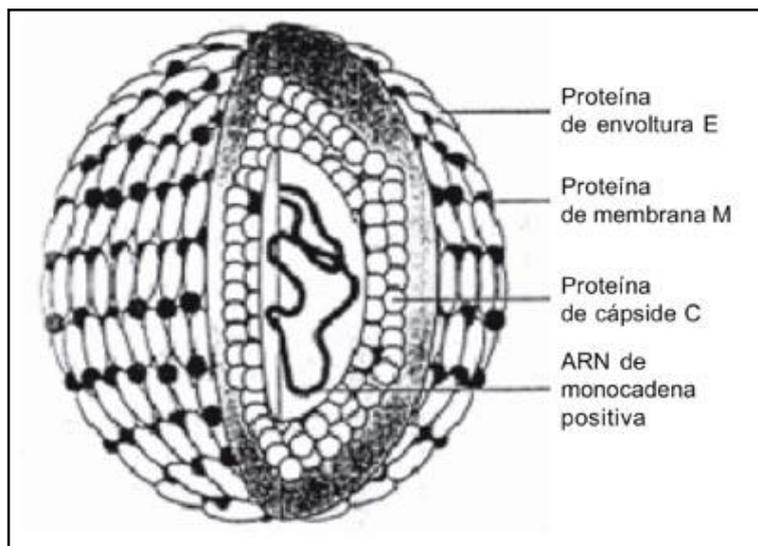


Figura 3: Estructura del virus del dengue

Fuente: Cabezas, *et al.*, 2005

El genoma del virus está constituido por una cadena simple de RNA de 10,7 Kb de polaridad positiva, es decir que no necesita DNA intermedio para su replicación; resultan idénticos al RNA mensajero (mRNA) por lo que pueden ser traducidos por la célula infectada (Uribarren, 2010).

El virión completo mide aproximadamente 50 nanómetros presentando una forma esférica, tiene un único marco de lectura abierto de entre 10158 bases del DENV-4 y 10173 bases de los serotipos DENV-2 y DENV-3 codificantes de poliproteínas de cerca de 3400 aminoácidos (Günther, 2007, pág. 16). Esta flanqueado por dos regiones no traducidas en los extremo 5' y 3' que codifican para una poliproteína dividida por proteasas celulares y virales, resultando tres proteínas estructurales (proteína C, M, E) y siete no estructurales (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5) (Fajardo, 2011, pág. 10); producto de un procesamiento proteolítico cotraduccional y postraduccional (Montes, 2001). Está compuesto por un 6% de RNA, 66% de proteínas, 9% de carbohidratos y 17% de lípidos; el virión es infeccioso (Cabezas, y otros, 2005, pág. 215).

Dentro de las proteínas estructurales se encuentran: la proteína C (primer polipéptido viral sintetizado) que es componente de la nucleocápside y el núcleo que rodea y protege al RNA, la proteína M que es una derivación de la proteólisis de prM (precursor de membrana contenido en el virus inmaduro intracelular en la etapa de maduración viral) y forma la membrana viral; la proteína E, la más grande del virión, conforma la envoltura y está relacionada con la penetración del virus al medio celular (Montes, 2001) (Fajardo, 2011, pág. 17). Las proteínas no estructurales NS1, NS3 y NS5 son extremadamente conservadas entre los cuatro serotipos del virus, la NS3 posee funciones requeridas para la síntesis de RNA viral y la formación de la cápside; además de su función proteasa al formar un complejo con NS2B siendo el responsable del corte de NS2B, NS3, NS4A, NS5 y el extremo carboxilo de la proteína C (Fajardo, 2011, pág. 15). Por su parte las proteínas NS2A, NS2B, NS4A y NS4B presentan un comportamiento hidrofóbico. Las proteínas NS4A y NS4B tienen como función la formación de un complejo replicativo en la membrana del retículo endoplasmático. La proteína NS5 actúa como una RNA polimerasa dependiente de RNA (Günther, 2007, pág. 15). Las funciones de algunas de las proteínas tanto estructurales como no estructurales se detallan en la figura 4.

Organización del genoma del virus del dengue



C:	Encapsidación RNA
E:	Unión y fusión celular Principales epítomos inmunológicos
NS2A:	Inhibición de la señal del interferón
NS3:	Proteasa serina (con NS2B) Helicasa RNA trifosfatasa
NS4B:	Inhibición de la señal del interferón
NS5:	RNA polimerasa Metiltransferasa

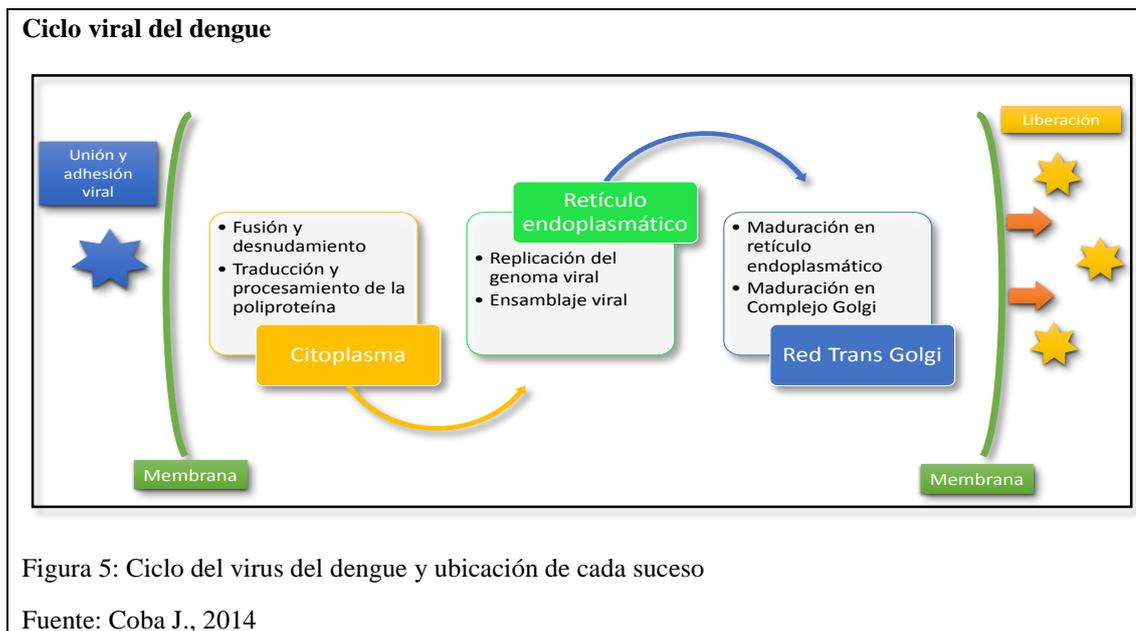
Figura 4: Organización de las proteínas estructurales y no estructurales en el genoma del virus del dengue y su función.

Fuente: Coba J., 2014

Debido a la ausencia de una actividad correctora en la RNA polimerasa, el virus presenta una elevada tasa de error al momento de su replicación; esto produce su organización en poblaciones de alta diversidad genética (cuasi especies) que le da al virus su capacidad de adaptación a los cambios selectivos (Domingo, 2002, pág. 462). La circulación simultánea de diferentes genotipos virales de un mismo serotipo del virus en un hospedero genera una recombinación entre cepas del virus del dengue que tiene como producto el desarrollo de nuevas cepas con mayor capacidad de transmisión, replicación y virulencia; esto desemboca en el alto grado de variabilidad genética que presentan los serotipos del virus del dengue (Twiddy & Holmes, 2003, pág. 433).

2.4.1 Ciclo viral

El ciclo viral comprende las etapas desde la entrada de la partícula viral a la célula, hasta su liberación al citoplasma, resumido en la figura 5 y figura 6; tiene como punto de partida la ingestión de sangre infectada por hembras de *Aedes aegypti*; las personas enfermas de dengue pueden transmitir el virus a un mosquito durante un periodo de tiempo de pocos días anteriores a la finalización del periodo febril (Laredo, Guo, & Bocanegra, 2012, pág. 29).



En los mosquitos el virus del dengue infecta a las células epiteliales del intestino medio, diseminándose por la lámina basal hacia el sistema circulatorio infectando las células de las glándulas salivales, donde el virus se torna persistente debido a la replicación que ahí ocurre en un periodo de tiempo entre ocho y doce días posteriores a la ingestión sanguínea (Uribarren, 2010).

Ciclo del virus del dengue en la célula

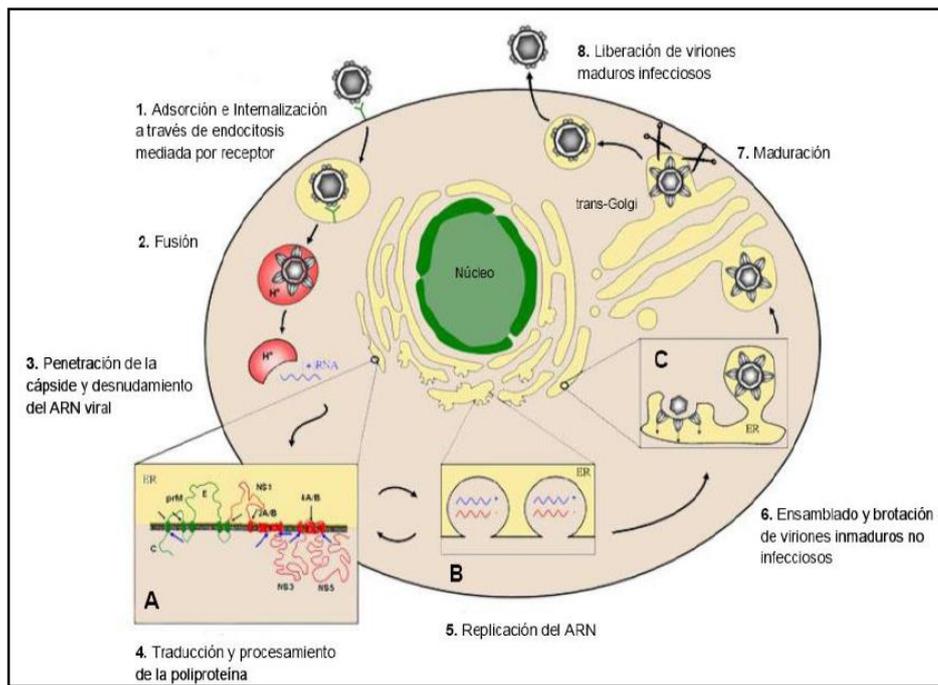


Figura 6: Ciclo del virus del dengue en la célula.

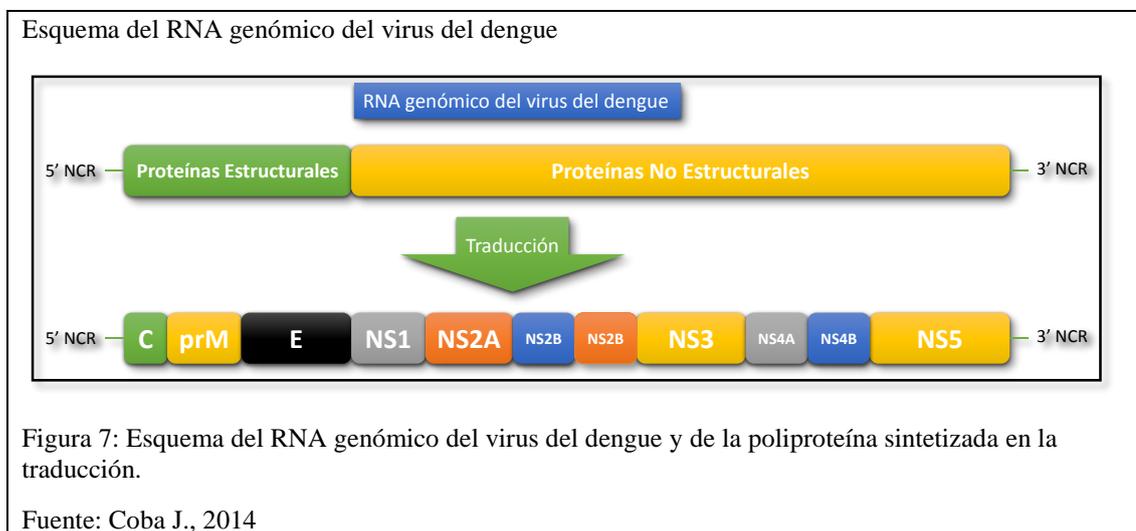
Fuente: Mamani, 2013

2.4.2 Entrada de la partícula viral

El ingreso del virus del dengue a las células de mamíferos como también a las del mosquito, inicia con el acercamiento de la partícula viral a la superficie celular y la glicoproteína E, mediante su dominio III (ubicado en el extremo carboxiterminal); interactúa con proteínas o proteoglicanos de la membrana celular (como el heparán sulfato de carga negativa que puede actuar como receptor primario para favorecer el acercamiento de las partículas virales) que intervienen en la unión y endocitosis del virus mediada por receptores (posiblemente correceptores) (Velandia & Castellanos, 2011, pág. 37) (Fajardo, 2011, pág. 14). Posteriormente la vesícula endocítica se transforma en endosoma temprano, seguido de una transformación a endosoma tardío; este se fusiona con un lisosoma que acidifica el pH de la vesícula lo que genera un cambio de conformación en el dominio II de la glicoproteína E, favoreciendo la exposición y el anclaje del péptido de fusión a la membrana de la vesícula. Esto desemboca en la liberación de la nucleocápside al citoplasma (Velandia & Castellanos, 2011, pág. 37) (Montes, 2001).

2.4.3 Traducción y replicación del RNA

Los procesos de traducción y replicación del RNA ocurren en el citoplasma; el RNA genómico del virus del dengue es monocatenario de polaridad positiva (que actúa directamente como mRNA) con un único marco de lectura que traduce un polipéptido que es procesado en el retículo endoplasmático por proteasas celulares y por la actividad NS3pro, que libera las tres proteínas estructurales y las siete no estructurales (encargadas de la replicación viral y ensamblaje viral) de manera ordenada como se explica en la figura 7 (Velandia & Castellanos, 2011, pág. 38) (Mamani, 2013, pág. 15).



La replicación puede ser detectada tres horas posteriores a la infección, es un proceso que no está comprendido en su totalidad, pero se plantea que ocurre en la región perinuclear de la célula infectada. En estudios *in vitro* se han podido detectar tres especies de RNA en función de su coeficiente de sedimentación: 20S, 20/28S y 40S. Los RNA 20S están constituidos por dos cadenas de RNA de polaridad contraria (positiva y negativa); no son degradados por RNAsas y se los conoce como formas de replicación debido a que incluye los intermediarios negativos que actúan como plantilla para la síntesis de los RNA de polaridad positiva. Los RNA de 20 a 28S se conocen como intermediarios de replicación y corresponden a hebras de RNA de polaridad positiva en proceso de elongación. Los RNA 40S corresponden al RNA genómico encontrado en los virus ensamblados, pueden ser empleados en la traducción

proteica o a su vez para formar junto con la proteína C, la riboproteína (nuevos viriones); este tipo de RNA puede ser degradado por RNAsas (Montes, 2001) (Velandia & Castellanos, 2011, pág. 39).

En la etapa de traducción, el polipéptido es acompañado por las proteínas BiP, calnexina y calreticulina; posteriormente cada proteína viral se organiza en la membrana del retículo endoplasmático y es procesada por proteasas como la furina, signalasa o NS3Pro para ser modificadas después de la transducción (Velandia & Castellanos, 2011, pág. 39).

2.4.4 Ensamblaje, maduración y liberación de la partícula viral

El proceso de ensamblaje de las partículas del virus del dengue no es conocido en su totalidad, sin embargo tras algunos experimentos se ha sugerido que ocurre en las distensiones del retículo endoplasmático conocidas como membranas convolutas; es aquí donde además ocurre el proceso de traducción de la proteína simultáneamente con el ensamblaje del virus (Velandia & Castellanos, 2011, pág. 39) (Resino, 2006). La formación de la nucleocápside determina el inicio del ensamblaje, esto por interacción del RNA genómico y la proteína C en presencia de pequeñas cantidades de lípidos; posteriormente se asocian las proteínas prM/M y E inmersas en la membrana del retículo endoplasmático (Velandia & Castellanos, 2011, pág. 40) (Montes, 2001).

La maduración de la partícula viral del dengue, ocurre en dos etapas: en primer lugar las proteínas prM/M y E se organizan de forma heterodimérica, siendo la proteína prM/M, el recubrimiento de la proteína E confiriéndole un aspecto rugoso. La siguiente etapa está marcada por la transición de la partícula generada en el paso anterior, desde el retículo endoplasmático hasta las regiones *cis* y *trans* del complejo de Golgi; es aquí donde se inicia la siguiente etapa de maduración donde los cambios de disposición y rotación de la proteína E generan homotrímeros antiparalelos de sí misma; esto le otorga a la partícula viral una apariencia de superficie lisa (Perera & Kuhn, 2008) (Velandia & Castellanos, 2011, págs. 39-40).

Finalmente cuando se libera el virus, el pH neutro del espacio extracitoplasmático genera el desprendimiento del péptido pr; la proteína E que ha logrado su conformación final, es reconocida por las moléculas receptoras de las células sensibles

para iniciar nuevamente el ciclo de infección (Perera & Kuhn, 2008) (Velandia & Castellanos, 2011, pág. 40).

2.4.5 Transmisión vertical en el vector

Además de la transmisión horizontal del virus del dengue que implica una interacción mosquito-humano-mosquito, existe el mecanismo de transmisión vertical donde el virus es transmitido entre mosquitos. “Comúnmente en epidemiología, este término es empleado para referirse a la transmisión transovárica” (Hernández, 2002, pág. 210). Este mecanismo está involucrado con la persistencia del virus en la naturaleza, el mismo que ha sido documentado para otros *flavivirus* (Günther, 2007, pág. 23) (Montes, 2001, pág. 5).

Estudios realizados por Lee & Rohani, 2005, Hartanti, Suryani, & Tirtadjaja, 2010 y Rosen, Shroyer, Tesh, Freier, & Lien, 1983; demuestran transmisión transovárica del virus del dengue, desde hembras adultas hacia huevos y larvas colectadas en campo, lo que demuestra que este tipo de transmisión ocurre en la naturaleza y está implicado con la persistencia del virus en ciertas regiones (Günther, 2007, pág. 23).

Sin embargo la tasa de infección de los individuos analizados con este objetivo, es muy baja (menor al 1%); su importancia radica en la supervivencia del virus en periodos de tiempo con condiciones ambientales adversas para la reproducción del vector, gracias a la gran adaptabilidad y resistencia de los huevos fecundados que han permanecido latentes en desecación y continúan su proceso de maduración cuando el agua acumulada da lugar a la formación de criaderos; esto explicaría los brotes anuales de dengue al inicio de la época lluviosa (Hernández, 2002) (Günther, 2007, pág. 24), (Lee & Rohani, 2005, pág. 107), (Hartanti, Suryani, & Tirtadjaja, 2010, pág. 68).

CAPÍTULO 3

ÁREA DE ESTUDIO Y METODOLOGÍA

3.1 Delimitación del área geográfica

La provincia de Santo Domingo de los Tsáchilas fue la localidad con la tasa más alta de dengue grave por cada 100000 habitantes en el Ecuador para el año 2012; “con un porcentaje de 18,73 y un total de 74 casos de la enfermedad” (Ministerio de Salud Pública, 2012).

La “Cooperativa de Vivienda Provincias Unidas” está ubicada en la parroquia Abraham Calazacón al sur-occidente de la ciudad de Santo Domingo en el km. 3 de la vía hacia el Recinto “El Poste”. Está conformada por 20 manzanas y cerca de 208 viviendas cubriendo un área de aproximadamente de 82.000 m² (figura 9). Es una zona peri-urbana que no dispone de los servicios básicos de agua potable ni alcantarillado, tampoco cuenta con adoquinado ni pavimentación en sus calles a excepción de la vía al recinto “El poste” que atraviesa la zona longitudinalmente (figura 8).

Ubicación de la Cooperativa de Vivienda Provincias Unidas en la ciudad de Santo Domingo, Provincia de Santo Domingo de los Tsáchilas; Ecuador

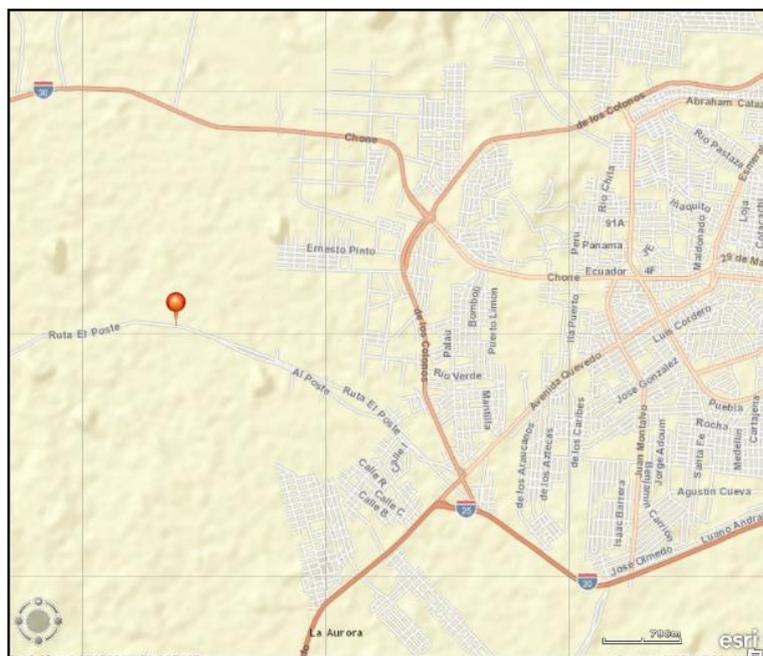
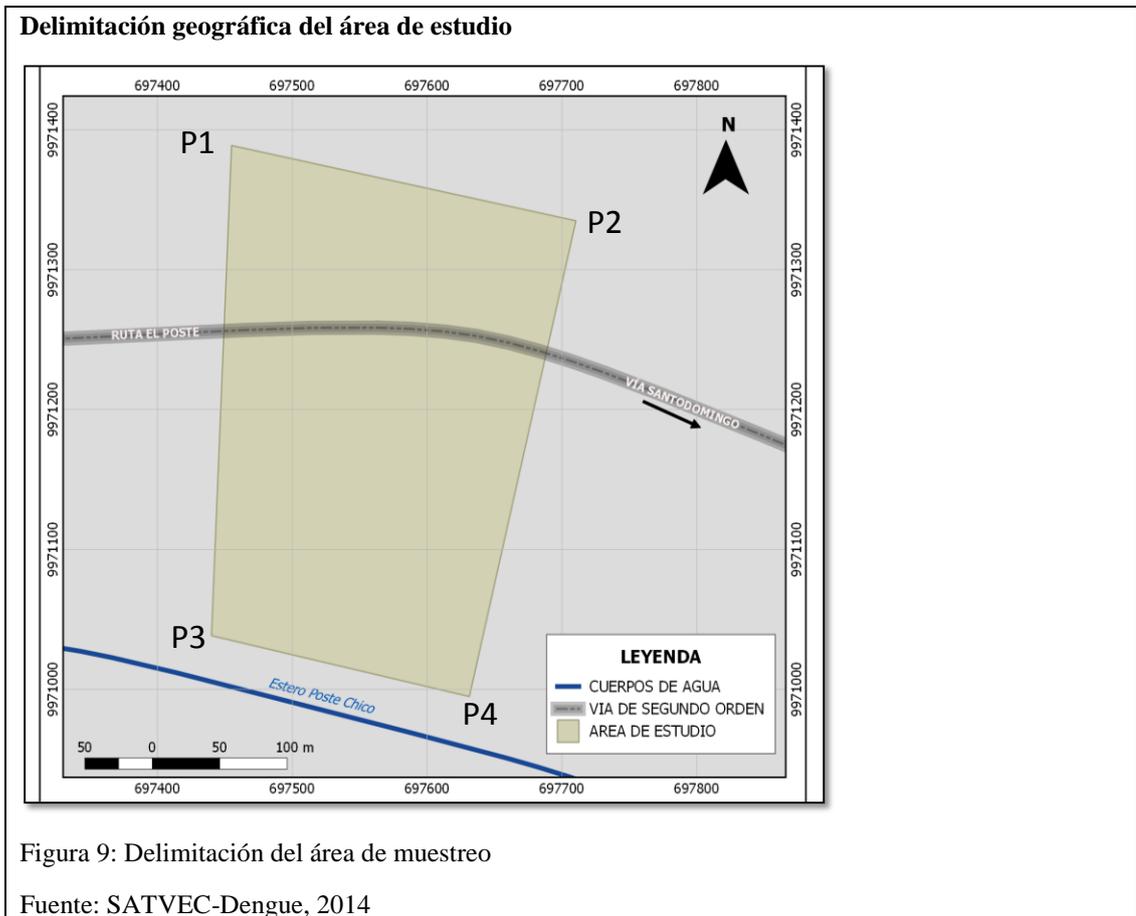


Figura 8: Ubicación del área de muestreo en la ciudad de Santo Domingo de los Tsáchilas

Fuente: SATVEC-Dengue, 2014

Las coordenadas obtenidas en los puntos límites del barrio son los siguientes:

- P1: -79.22578; -0.25875
- P2: -79.22351; -0.25923
- P3: -79.22591; -0.2619
- P4: -79.22422; -0.26228



3.2 Captura de adultos de *Aedes aegypti* en campo y toma de datos georeferenciales

La captura de *Aedes aegypti* en la Cooperativa de Vivienda Provincias Unidas, se realizó siguiendo el protocolo de captura de adultos de *Aedes aegypti* del proyecto “Sistema Nacional de Vigilancia y Alerta Temprana para el Control del Vector de Dengue y Fiebre Amarilla” SATVEC- PIC-12-INH-002, SENESCYT Convenio N°20120469. Las colectas en campo se realizaron durante la primera semana de cada mes, entre enero a abril de 2014; donde las condiciones climáticas son propias de la

estación lluviosa, siendo un escenario óptimo para la aparición de criaderos de mosquitos.

Posterior al reconocimiento del lugar de muestreo y sus límites se tomó como punto de inicio a la vivienda ubicada frente a la escuela “César Augusto Guamán Cando” ubicada en zona sur-oeste del área. En la primera visita, se recolectaron datos socio-económicos de los habitantes del sector junto con las muestras de fases inmaduras de culícidos en las viviendas como contempla el protocolo de salidas técnicas de muestreo del proyecto SATVEC Dengue (SATVEC Dengue, 2013).

El procedimiento de captura se realizó durante las horas del día entre las 8:00 y 17:00 horas, cuando el vector se encuentra en los lugares de descanso; posterior a una presentación explicativa a los habitantes de la vivienda visitada sobre las actividades a realizarse y bajo consentimiento verbal de los propietarios, para que nos permita el ingreso a la misma, se procedió con la codificación de la vivienda que corresponde a un código numérico que fue asignado de manera ascendente, en función del orden de visita.

La toma de datos geográficos de latitud y longitud se la realizó con un equipo de GPS (Global Positioning System) de la marca “Magellan explorist 110”. Los parámetros de altitud y hora de captura fueron tomados con un equipo de monitoreo ambiental de la marca “WindMate WM-350”. Todos estos datos obtenidos fueron ingresados en la “Planilla de Captura de Adultos de *Aedes aegypti*” que se muestra en el anexo 2 (SATVEC Dengue, 2013).

Para la recolección de individuos adultos de *Aedes aegypti* se realizó una aspiración con la aplicación del aspirador entomológico de mochila de la marca “Entomopraxis G855” (figura 10) en el interior de las viviendas; en los dormitorios, bajo las camas, detrás de muebles, entre los toldos y principalmente entre la ropa. El tiempo de aspiración en cada vivienda fue entre 20 y 30 minutos. Posterior a la aspiración de insectos, es importante el mantenimiento de los individuos vivos en los colectores hasta su siguiente tratamiento de conservación.

3.3 Identificación morfológica, selección y almacenamiento de individuos en campo

Debido a que la aspiración captura todo tipo de insectos presentes en el interior de las viviendas, fue necesaria la identificación y selección de los individuos de interés, es decir las hembras de *Aedes aegypti*.

En el mismo orden de aspiración de las viviendas, se expuso a los insectos a Acetato de Etilo provocando su muerte, para esto se empleó un algodón o papel absorbente ubicándolo en la parte inferior del colector del aspirador que tiene una malla, evitando que el solvente se volatilice fuera de ella.

Aspirador entomológico de mochila y colectores de la marca entomopraxis G855



Figura 10: Aspirador entomológico de mochila empleado en los muestreos.

Fuente: Coba J., 2014

Posteriormente se realizó la identificación morfológica de los individuos de interés; el *Aedes aegypti* es caracterizado principalmente por ser de color oscuro, con rayas blanco-plateadas; en el tórax y muestra un diseño en forma de lira en su parte dorsal; tiene patas anilladas; presentan dimorfismo sexual, ya que los machos poseen antenas sensoriales más pilosas que las hembras como se muestra en la figura 11 (Almirón, 2009).

Morfología de la hembra de *Aedes aegypti*



Figura 11: Rasgos principales para identificación morfológica del *Aedes aegypti* macho y hembra.

Fuente: SATVEC-Dengue, 2014.

De los individuos encontrados se seleccionó únicamente las hembras que fueron sumergidas individualmente en tubos eppendorf de 1,5 mL con 500 μ L de reactivo RNAlater® (AM7021) de Life Technologies.

Después de transcurrida la semana de recolección y manteniendo las muestras en el campo, se llevó las mismas a congelación en ultra-congeladores a una temperatura de -80°C donde fueron conservados hasta su procesamiento.

Durante los muestreos realizados en el mes de enero de 2014, se mantuvo los mosquitos en etanol al 70%, como lo recomienda Cáceres (2003); con las temperaturas y condiciones citadas anteriormente.

3.4 Serotipificación Molecular

3.4.1 Reacción en cadena de la polimerasa con Transcripción Inversa Multiplex

La metodología de serotipificación molecular del virus del dengue mediante la aplicación de RT-PCR Multiplex en muestras de *Aedes aegypti* hembras capturadas en campo, contempla cuatro etapas:

- Extracción de RNA total
- Alineamiento de cebadores
- Programa de RT-PCR Multiplex

- Electroforesis

Previo al procesamiento de muestras obtenidas en campo, fue necesaria la estandarización de cada proceso principalmente en la etapa de extracción de material genético y condiciones del programa de RT-PCR.

Los controles positivos empleados en los ensayos, corresponden a un sobrenadante de cultivo celular en células C6/36 de *Aedes albopictus* infectados con cada serotipo del virus del dengue, fueron proporcionados por el Centro de Investigación Traslacional (CIT) de la Universidad de las Américas de Quito (UDLA).

3.4.1.1 Estandarización

El proceso de estandarización de la metodología molecular fue desarrollado en el laboratorio de Biología Molecular de Entomología Médica y en el laboratorio de Diagnóstico e Investigación Microbiológica del INSPI-Quito.

3.4.1.1.1 Extracción de RNA total

En primer lugar se realizó la estandarización del proceso de extracción de RNA total con el kit RNAqueous® Micro kit (AM1931) de Life Technologies; se siguieron los parámetros recomendados por el fabricante del kit para la recuperación de RNA de pequeños tamaños, entre ellos el RNA viral de interés. Las modificaciones que se realizaron corresponden al aumento del volumen de la solución de lisis y del etanol grado ACS a 125µL en lugar de 100µL en los primeros pasos del proceso de extracción; de igual manera es de gran importancia la conservación del material procesado en cadena de frío durante todo el proceso, incluyendo los pasos de centrifugación. El procedimiento de extracción se detalla en el anexo 7: Extracción de RNA total a partir de individuos de *Aedes aegypti*

A la vez se realizó la extracción de individuos adultos macho y hembra de *Aedes aegypti*, eclosionados en el insectario del Instituto Nacional de Investigaciones en Salud Pública, junto con una alícuota de 10µL de sobrenadante del cultivo celular en células C6/36 de *Aedes albopictus* de cada uno de los serotipos del virus del dengue, siguiendo la metodología planteada por Harris y otros (1998). El empleo de individuos machos y hembras en los controles tanto negativos como positivos de estos ensayos,

ayudan a comprobar que no existen fragmentos de RNA en los individuos que generen amplificaciones inespecíficas o falsos positivos por unión a los cebadores empleados.

Para superar problemas relacionados con la obstrucción de los filtros de extracción con estructuras de los mosquitos, se dejó reposar al mosquito en la solución de lisis en frío durante aproximadamente un minuto, tras lo cual se procedió a su trituración con un pistilo estéril con la ayuda de un homogeneizador Power Gen, lo que nos permite una trituración más efectiva y más rápida en la solución de lisis, algo que no se lograba mediante la trituración manual; además bajo recomendaciones del fabricante del kit de extracción se procedió a agregar 50µL más de etanol 100% grado ACS en las columnas obstruidas con estas estructuras (Life Technologies, 2010).

3.4.1.1.2 RT-PCR Multiplex

Posterior a la obtención del material genético fue necesaria la estandarización del programa empleado en el termociclador GenMate B960, para la amplificación mediante RT-PCR Multiplex de los cuatro serotipos del virus del dengue. Para esto fue necesario comprobar la homología de los cebadores utilizados con el genoma de cada serotipo en estudio, empleando el software MEGA 6.0 junto con la página del National Center for Biotechnology Information (NCBI). Los cebadores usados en el estudio fueron los descritos por Lanciotti y otros (1992) y por Harris y otros (1998) (tabla 1), que están dirigidos a la amplificación genómica de la región C/prM, que codifica para las proteínas estructurales de la cápside y el precursor de membrana; este fragmento está flanqueado por una secuencia conservada entre todos los serotipos del virus del Dengue (Organización Panamericana de la Salud, 2013, pág. 88). El cebador D1 actúa como forward para todos los serotipos, mientras que los cebadores TS1, TS2, TS3 y DEN4 actúan de manera específica (tabla 2).

Tabla 1**Secuencias de los cebadores empleados en el estudio.**

Nombre del cebador	Secuencia
D1	5'-TCAATATGCTGAAACGCGCGAGAAACCG-3'
TS1	5'-CGTCTCAGTGATCCGGGGG-3'
TS2	5'-CGCCACAAGGGCCATGAACAG-3'
TS3	5'-TAACATCATCATGAGACAGAGC-3'
DEN4	5'-TGTTGTCTTAAACAAGAGAGGTC-3'

Notas: Cebadores D1, TS1, TS2 y TS3 empleados por Laciotti et al. 1992.

Cebador DEN4 empleado por Harris et al, 1998.

Elaborado por: Coba J., 2014

Tabla 2**Tamaños de fragmento y cebadores empleados en la amplificación.**

Serotipo	Cebadores involucrados	Tamaño de fragmento
DENV-1	D1 + TS1	482 pb
DENV-2	D1 + TS2	119 pb
DENV-3	D1 + TS3	290 pb
DENV-4	D1 + DEN4	392 pb

Notas: Harris, *et al.*, 1998; Laciotti, *et al.*, 1992

Elaborado por: Coba J., 2014

Las concentraciones de reactivo para la preparación de la Mastermix empleada en la PCR y las condiciones de cada etapa de termociclado se detallan en la tabla 3 y tabla 4.

Tabla 3**Volúmenes y concentraciones empleados por reacción de mastermix**

Agente	Volumen (1 reacción)	Concentración Inicial	Concentración final en reacción
2X Reaction Mix			
MgSO ₄	12,5 µL	2X	1,6 mM
dNTPs			200µM
Muestra de RNA	5 µL		
Primer Forward: D1	0,5 µL	10µM	0,2 µM
TS1	0,5 µL		0,2 µM
TS2	0,5 µL	10µM	0,2 µM
TS3	0,5 µL	10µM	0,2 µM
DEN4	0,5 µL	10µM	0,2 µM
SuperScript III RT / Platinum Taq Mix	0.7 µL	200U SuperScript; 1U Taq Platinum / µL	140U SuperScript; 0,7U Taq Platinum
Agua	Hasta volumen final= 25µL		

Notas: Life Technologies, 2011

Elaborado por: Coba J., 2014

Tabla 4**Programa de RT-PCR Multiplex**

Etapa de la RT-PCR	Número de Ciclos	Temperatura (°C)	Tiempo
Síntesis de cDNA	1	51	30 min
Denaturación	1	94	2 min
Amplificación	40	94	15 seg
		55	30 seg
		68	1 min
Extensión Final	1	68	5 min

Notas: Life Technologies, 2011

Elaborado por: Coba J., 2014

Para la estandarización del programa de RT-PCR Multiplex one step, en primer lugar se trabajó en la temperatura ideal de síntesis de cDNA que se determinó a 50°C durante 30 minutos, para esto se realizaron ensayos en gradiente de temperatura en un termociclador MasterCycler de la marca Eppendorf, entre los 45°C hasta los 60°C durante 30 minutos que es el rango recomendado por el fabricante del kit (Life Technologies, 2011).

Durante el proceso de estandarización del programa de RT-PCR se presentaron una serie de problemas relacionados con la aparición de fragmentos inespecíficos amplificados por lo que se trabajó con base en las recomendaciones del fabricante del kit SuperScript® III One-Step RT-PCR System with Platinum® *Taq* DNA Polymerase de Invitrogen, donde se sugieren modificaciones en la temperatura de annealing y en la concentración de sulfato de magnesio (MgSO₄) en la reacción, cuya función es la de regular la actividad de la enzima polimerasa para obtener una cantidad adecuada de copias del fragmento de interés. Sin embargo, con base en la información proporcionada en el inserto del kit para RT-PCR, se llegó a la resolución de no modificar la concentración de magnesio en la reacción, puesto que el contenido de la misma era el adecuado (Life Technologies, 2011).

Bajo estos análisis se decidió modificar la temperatura de annealing en los ciclos de amplificación por PCR, para esto se tomó como referencia la menor temperatura del rango indicado por el fabricante (55°C – 65°C) en un ensayo de RT-PCR en gradiente de temperaturas en un termociclador MasterCycler Gradient de la marca Eppendorf; empleando cada uno de los controles positivos de los serotipos del virus del dengue

(DENV-1, DENV-2, DENV-3 y DENV-4) en un mismo vial de reacción, con la finalidad de determinar las condiciones adecuadas para una RT-PCR Multiplex donde se puedan apreciar las cuatro bandas de los productos con la mayor claridad; de esta manera se definió a la temperatura de annealing en 55°C debido a que a mayores temperaturas, la especificidad de los cebadores que amplifican el DENV-4 se veía afectada y perdía definición en la banda esperada.

3.4.1.1.3 *Electroforesis*

La migración electroforética se la realizó en una cámara de electroforesis horizontal de la marca VWR y una fuente de poder de la marca CBS Scientific; se preparó el gel de agarosa al 2% de la marca Invitrogen en buffer TAE 0,5X, teñido con 60000 unidades de SYBR Safe. Se cargó 2µL del buffer de carga BlueJuice junto con 6µL del producto de RT-PCR. Las condiciones de electroforesis fueron determinadas en 80 voltios durante 100 minutos.

Las fotografías del gel fueron adquiridas en un fotodocumentador BioRad ChemiDoc XRS, junto con el software QuantityOne.

3.5 **Análisis estadístico de resultados**

La prevalencia y seroprevalencia aparente del virus del dengue en la Cooperativa de Vivienda Provincias Unidas ubicada en la ciudad de Santo Domingo de los Tsáchilas, se lo realizó empleando la ecuación de prevalencia aparente (Salman, 2009, pág. 3), (Jaramillo & Uriza, 2005, pág. 1853) y (Acuña, 2002, pág. 41).

$$\text{Prevalencia aparente} = \frac{\text{individuos positivos a la prueba}}{N \text{ (total de individuos analizados)}} * 100$$

Se determinó la prevalencia aparente del virus del dengue, en el área de estudio durante el periodo de enero a abril de 2014 y de cada uno de los meses independientemente y la prevalencia aparente de cada uno de los serotipos del virus del dengue, encontrados en el área de estudio.

Con la aplicación del software QGIS 2.6.1 se desarrollaron mapas indicando los puntos geográficos de las viviendas donde se evidenció la presencia del vector *Aedes aegypti* y la presencia del virus del dengue.

Para relacionar la presencia del virus con la zona de colecta y el mes de captura se realizó un ANOVA, utilizando el software Minitab.

CAPÍTULO 4

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Serotipificación Molecular

4.1.1 Reacción en cadena de la polimerasa con Transcripción Inversa Multiplex

4.1.1.1 Estandarización

4.1.1.1.1 RT-PCR Multiplex

Como parte de los resultados obtenidos dentro de la metodología de RT-PCR Multiplex, se encuentra la evaluación del nivel de especificidad de los cebadores empleados en el estudio. Mediante un análisis conjunto con el programa MEGA 6.0 y el Primer Blast del National Center for Biotechnology Information (NCBI) (anexo 3: Manual de procedimiento para el alineamiento de los cebadores D1, TS1, TS2, TS3 y DEN4, con los genomas de los cuatro serotipos del virus del dengue.) se demostró la alta homología de los cebadores con los genomas de los cuatro serotipos del virus del dengue, junto con la no-homología a otras regiones de los genomas; como lo plantean Harris y otros (1998) y Lanciotti y otros (1992).

En relación al programa de RT-PCR, se determinaron las condiciones adecuadas para los pasos de síntesis de cDNA e hibridación. En el primer caso, se determinó un ciclo de 30 minutos a 51°C; posteriormente la temperatura de hibridación (annealing) del programa de RT-PCR fue determinado a 55°C, debido a que un incremento de la misma produce la pérdida de nitidez de la banda correspondiente al serotipo DENV-4 como se muestra en la figura 12. De igual manera se trabajó en la concentración de los cebadores en la reacción para disminuir los dímeros de primers; en las muestras procesadas no se evidenció un cambio significativo, ya que su presencia persistió hasta en las concentraciones más bajas evaluadas.

Ensayo de RT-PCR multiplex en gradiente de temperatura

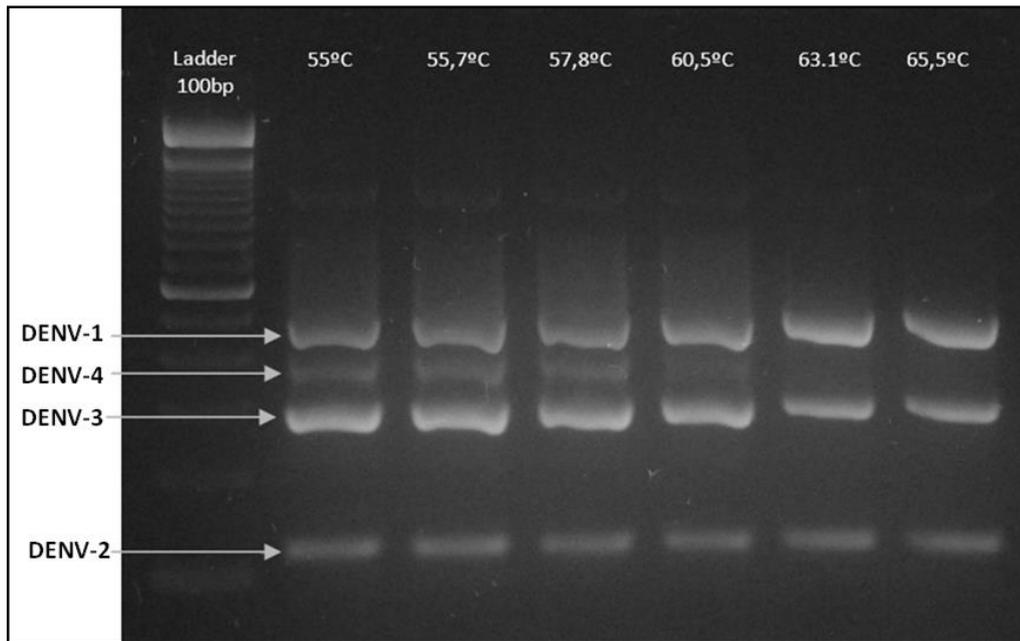


Figura 12: Gel de agarosa al 2%, ensayo de RT-PCR multiplex en gradiente de temperatura de annealing para controles positivos del virus del dengue

Elaborado por: Coba J., 2014

Como resultado de la aplicación de los protocolos estandarizados y el programa de RT-PCR con los controles positivos de cada serotipo del virus del dengue, se logró obtener las bandas de cada serotipo con el tamaño de fragmento descrito en la literatura (Lanciotti, Calisher, Gubler, Chang, & Vorndam, 1992, pág. 546) (Harris, y otros, 1998, pág. 2635) y analizado mediante el alineamiento de secuencias (figura 13).

Gel de agarosa con los cuatro serotipos del virus del dengue

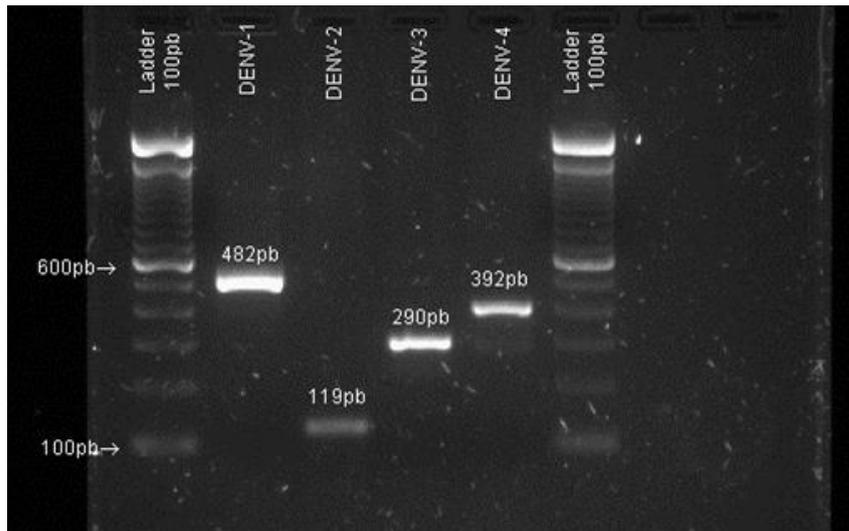


Figura 13: Gel de agarosa en 2%. Producto de estandarización de protocolo de RT-PCR multiplex con controles positivos de los cuatro serotipos del virus del dengue

Elaborado por: Coba J., 2014

4.1.1.1.2 Serotipificación del virus del dengue en *Aedes aegypti*

Se procesaron 49 individuos hembras de *Aedes aegypti* colectados durante los meses de enero a abril del 2014 (tabla 5).

Tabla 5

Resumen de resultados por mes de captura de *Aedes aegypti*

Mes de Captura	Individuos Capturados	Individuos Positivos	Serotipos Encontrados
Enero	11	3	DENV-2
Febrero	24	7	DENV-2
Marzo	5	2	DENV-1; DENV-3
Abril	9	0	-
Total	49	12	

Elaborado por: Coba J., 2014

En el mes de enero de 2014 se pudieron coleccionar 11 individuos, de los cuales 3 fueron positivos para el serotipo DENV-2. Es posible observar también una banda indeterminada en la muestra E20-1 (figura 14).

Muestras mes de enero de 2014

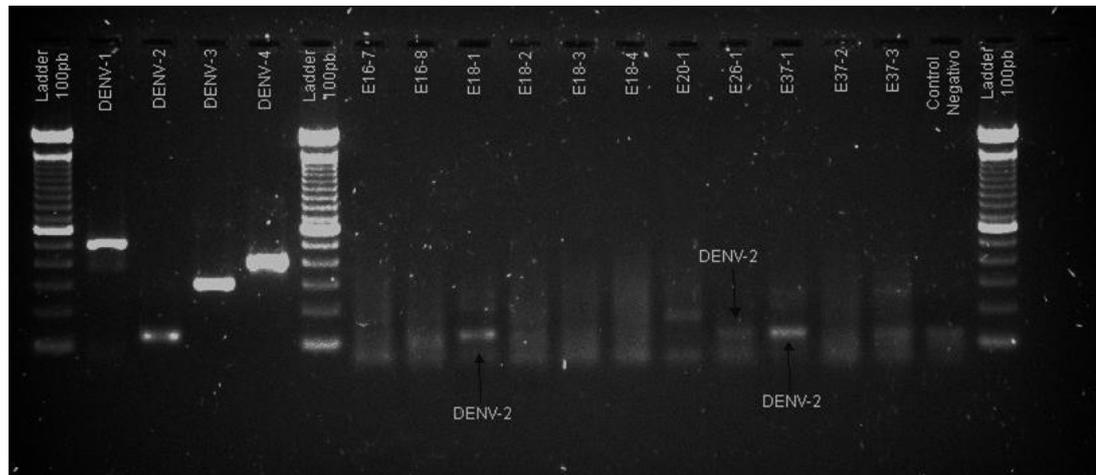


Figura 14: Gel de agarosa al 2% con los controles positivos de los cuatro serotipos del virus del dengue, muestras correspondientes al mes de enero y control negativo

Elaborado por: Coba J., 2014

En el mes de febrero de 2014, se coleccionaron la mayor cantidad de individuos hembra del mosquito vector, siendo también el mes donde se encontró la mayor cantidad de mosquitos infectados con el virus presentando únicamente el serotipo DENV-2. Como producto del análisis de la imagen, se puede determinar la presencia del serotipo DENV-2 en siete muestras (F1-2, F30-2, F30-4, F33-1, F37-1, F38-1 y F40-1), junto con la presencia de una nueva banda indeterminada en la muestra F1-1 (figura 15).

Muestras mes de febrero de 2014

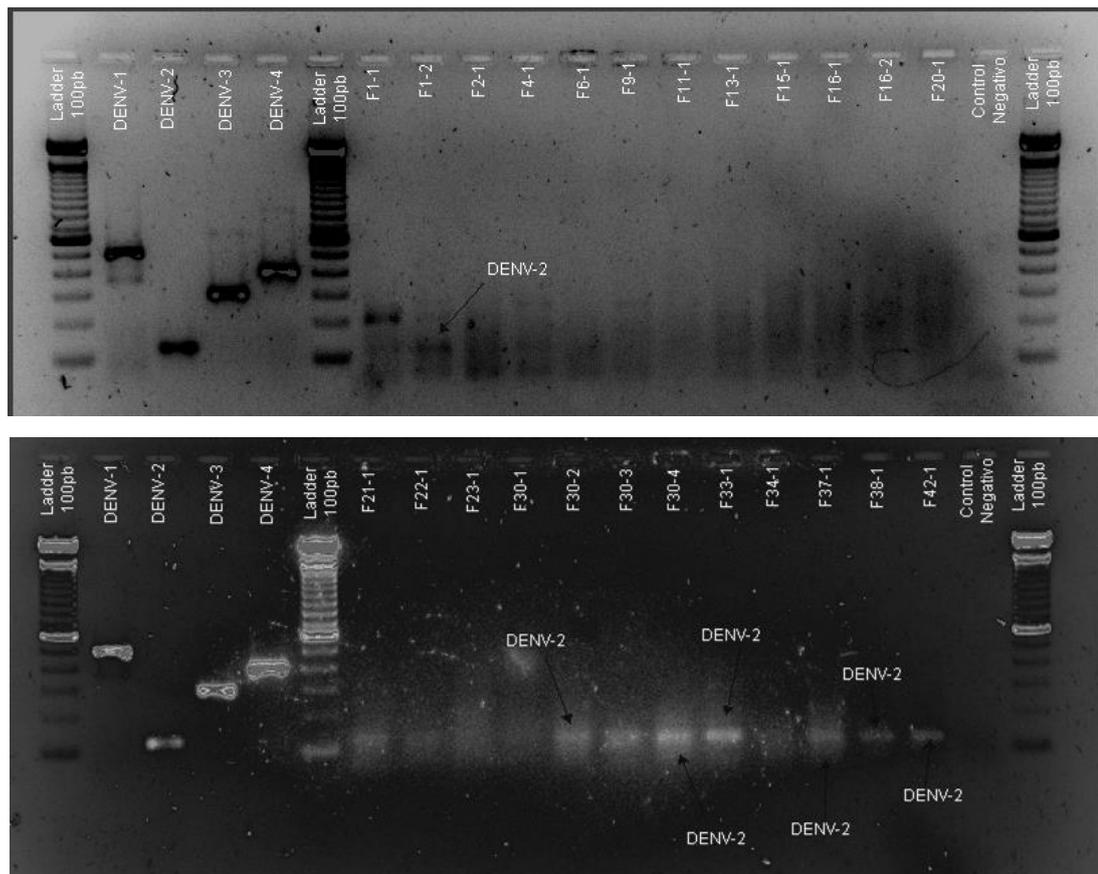


Figura 15: Geles de agarosa al 2% con los controles positivos de los cuatro serotipos del virus del dengue, muestras correspondientes al mes de febrero y controles negativos.

Elaborado por: Coba J., 2014

En el mes de marzo de 2014 se evidenciaron dos serotipos diferentes (DENV-1 y DENV-3) en los mosquitos capturados, siendo también el mes donde existe una mayor proporción de individuos infectados con relación al número de mosquitos capturados (tabla 5).

De las 5 muestras obtenidas, 2 individuos fueron positivos a la presencia del virus; la muestra M5-1 al serotipo DENV-3 y la muestra M34-1 al serotipo DENV-1. En la muestra M3-1 se pudo observar una banda bien definida pero indeterminada (figura 16).

Muestras mes de marzo de 2014

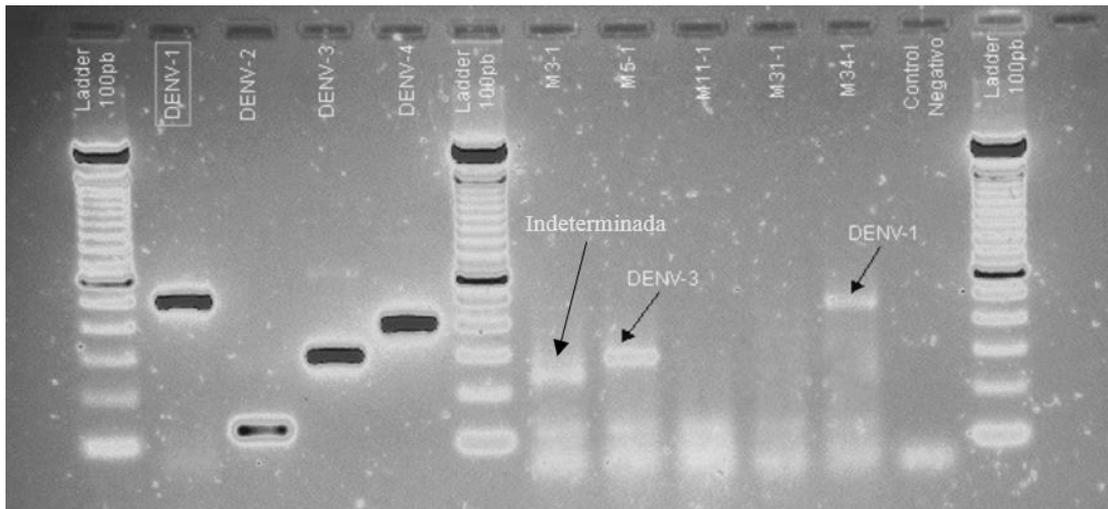


Figura 16: Gel agarosa al 2% con los controles positivos, muestras del mes de marzo de 2014 y control negativo

Elaborado por: Coba J., 2014

Durante el muestreo del mes de abril se obtuvieron 9 individuos *Aedes aegypti* hembras, los individuos analizados no fueron positivos a los serotipo del virus del dengue (figura 17).

Muestras mes de abril de 2014

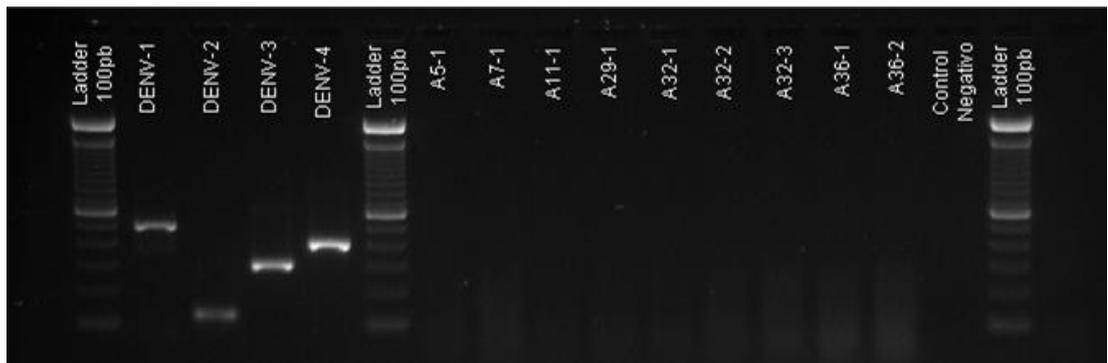


Figura 17: Gel agarosa al 2% con los controles positivos, muestras del mes de abril de 2014 y control negativo

Elaborado por: Coba J., 2014

4.2 Análisis estadístico de resultados

4.2.1 Prevalencia del virus del dengue en el área de estudio

La prevalencia calculada, nos indica que durante el mes de marzo de 2014, el virus del dengue presente en la población de *Aedes aegypti* capturados en la Cooperativa de Vivienda Provincias Unidas en Santo Domingo de los Tsáchilas, presenta la prevalencia más alta en relación con otros meses; se debe resaltar que durante este mes de muestreo únicamente se capturaron cinco hembras de las cuales dos resultaron positivas a la presencia del virus.

Por otra parte la prevalencia del virus durante el mes de febrero de 2014 corresponde al segundo valor más alto, siendo el tamaño de individuos analizados mucho mayor al del mes de marzo lo que representaría una mayor confiabilidad de este dato (tabla 6).

Tabla 6

Prevalencia del virus del dengue en el periodo de enero a abril de 2014

Prevalencia aparente enero-abril 2014	Prevalencia aparente enero	Prevalencia aparente febrero	Prevalencia aparente marzo	Prevalencia aparente abril
24.49%	27.27%	29.17%	40.00%	0.00%

Elaborado por: Coba J., 2014

El análisis de la Seroprevalencia aparente del virus del dengue en el área de estudio, cuyos datos se exponen en la tabla 7 y en la tabla 8, nos indica que el serotipo DENV-2 está presente en la mayor cantidad de individuos analizados y a su vez tiene el mayor valor de prevalencia que los otros dos serotipos encontrados en la población de *Aedes aegypti* colectados en el área de estudio; esto en parte concuerda con investigaciones realizadas por Valdés y otros (1999), en Santiago de Cuba, donde determina que el serotipo DENV-2 tiene una mayor prevalencia en los casos de dengue reportados en personas y que a su vez se lo ha relacionado con casos de dengue grave.

Tabla 7

Total de individuos positivos a cada serotipo del virus del dengue durante los meses de enero a abril de 2014

Serotipo	Total Individuos Positivos	Total de individuos capturados
DENV-1	1	49
DENV-2	10	
DENV-3	1	

Elaborado por: Coba J., 2014

Tabla 8

Seroprevalencia del virus del dengue del virus del dengue durante los meses de enero a abril de 2014

Prevalencia aparente DENV-1	Prevalencia aparente DENV-2	Prevalencia aparente DENV-3
2.04%	20.41%	2.04%

Elaborado por: Coba J., 2014

4.2.2 Distribución geoespacial de *Aedes aegypti* y el virus del dengue en el área de estudio

A partir de la información obtenida durante los muestreos de campo, se relacionó el número total de viviendas donde se evidenció presencia del mosquito vector y el número de viviendas donde se encontró el vector infectado, los detalles se incluyen en la tabla 9.

Tabla 9

Resumen de resultados de los muestreos realizados en el área de estudio.

Mes	Viviendas Muestreadas	Viviendas Positivas <i>Aedes aegypti</i>	Viviendas Positivas Virus	Número de hembras analizadas	Número de hembras positivas DENV
Enero	40	14	3	11	3
Febrero	42	19	6	24	7
Marzo	35	8	2	5	2
Abril	37	6	0	9	0
Total	154	47	11	49	12

Elaborado por: Coba J., 2014

Podemos observar en la tabla 10, que durante el mes de febrero existe la más alta proporción de viviendas positivas, tanto a la presencia del mosquito vector como del virus del dengue; durante el periodo de muestreo comprendido entre enero a abril del 2014, se tiene que el 29,83% de las viviendas visitadas, resultaron positivas a la presencia del vector, de las cuales el 19,5% mostraron presencia del virus, siendo este valor correspondiente al 6,88% del total de viviendas visitadas.

Tabla 10

Porcentajes obtenidos a partir de los análisis de resultados con base en el número de viviendas

Mes	Positivos <i>Aedes</i> / Total * 100	Positivo DENV / Positivos <i>Aedes</i> * 100	Positivo DENV / Total * 100
Enero	35	21,43	7,50
Febrero	45,24	31,58	14,29
Marzo	22,86	25	5,71
Abril	16,22	0	0
Promedio	29,83	19,50	6,88

Elaborado por: Coba J., 2014

En la figura 18, se muestran los resultados en función del número de hembras capturadas y analizadas en laboratorio. Es posible observar que durante el mes de marzo se tiene el valor de proporción más alto de individuos hembra de *Aedes aegypti* infectados con el virus del dengue, seguido por el mes de febrero y el mes de enero. Cabe resaltar que el número de individuos capturados y analizados durante el mes de marzo fue mucho menor a los de los meses anteriores.

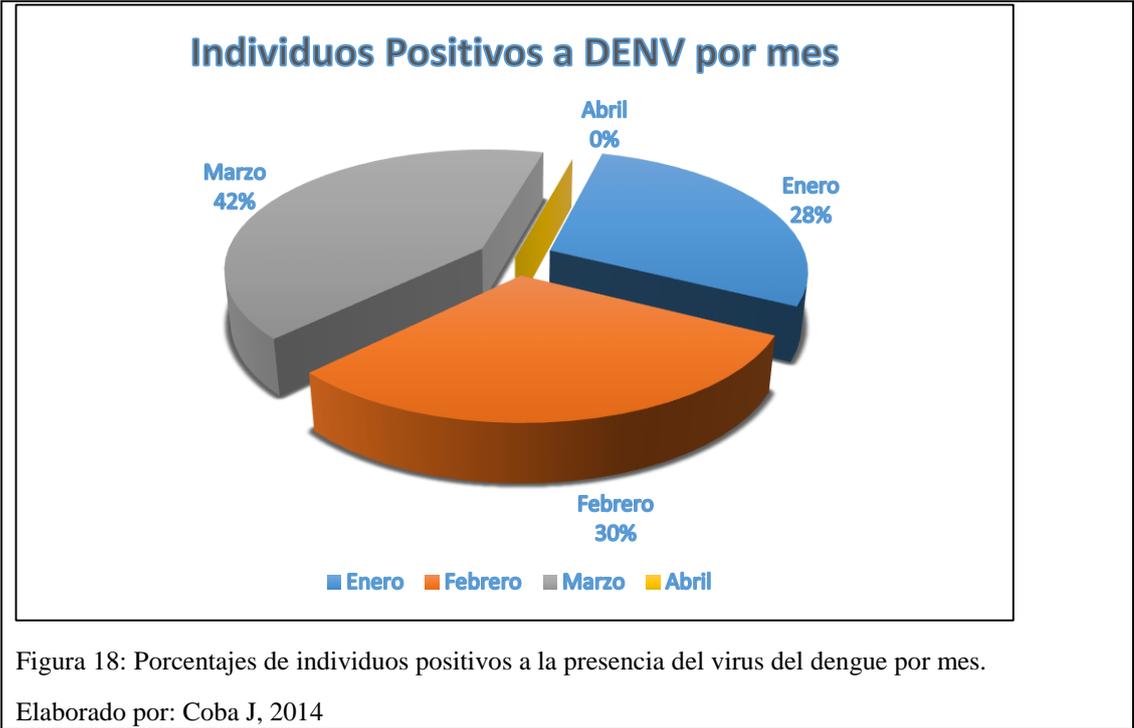


Figura 18: Porcentajes de individuos positivos a la presencia del virus del dengue por mes.

Los mapas desarrollados con el software QGIS 2.6.1, nos permiten determinar la dispersión geográfica tanto del mosquito vector del dengue como también del virus que lo produce. A partir de los datos georeferenciales colectados durante la etapa de muestreo en campo, se lograron plasmar las viviendas con presencia del mosquito vector (figura 19) y del virus del dengue (figura 20).

Mapa de presencia de *Aedes aegypti*

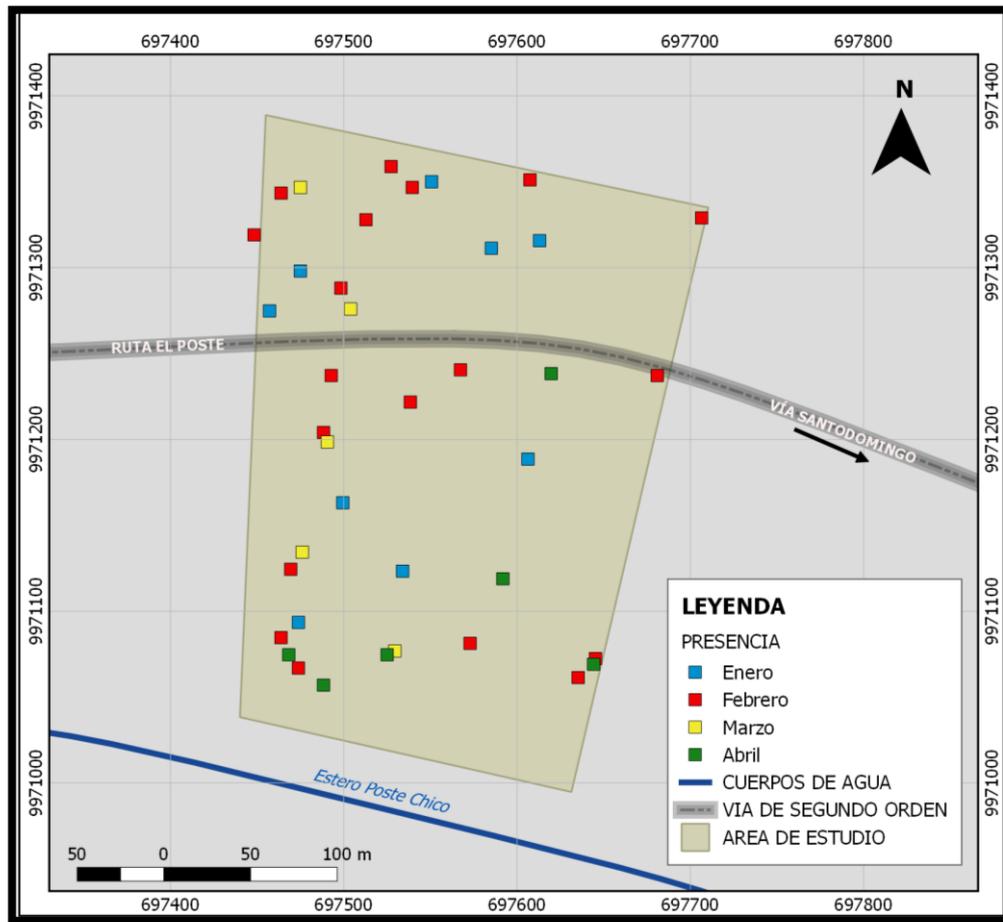


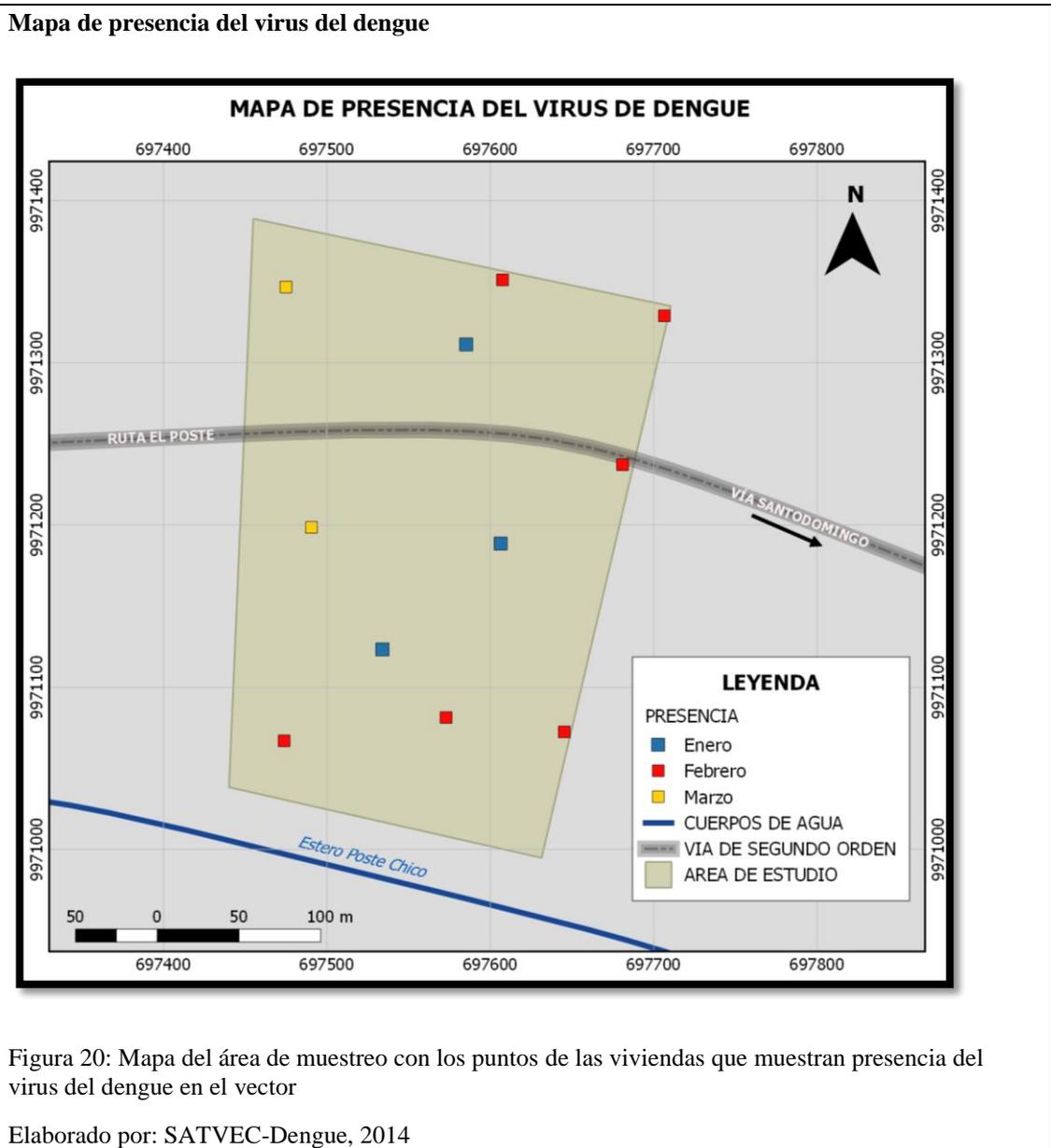
Figura 19: Mapa del área de muestreo con los puntos de las viviendas que muestran presencia de *Aedes aegypti*

Elaborado por: SATVEC-Dengue, 2014

Con base en el mapa (figura 19) se pueden observar dos puntos principales que muestran mayor hacinamiento de la población del mosquito vector durante el periodo de muestreo; la primera y más abundante se ubica en la parte nor-oeste del mapa mientras que la segunda, con menor abundancia, se encuentra en la parte sur-oeste. Aunque existan estos puntos de agrupación de la población del vector, es posible apreciar la amplia dispersión del mosquito en el área de estudio y cabe resaltar su presencia en un mismo punto o puntos muy cercanos hasta por tres meses seguidos.

En el mapa expuesto en la figura 20 se muestran los puntos geográficos de las viviendas donde los análisis mediante RT-PCR arrojaron resultados positivos de la presencia del virus del dengue en los mosquitos vectores capturados en el interior. Es

posible apreciar la gran dispersión del virus y principalmente la ausencia del virus en un mismo lugar en el área durante el periodo de estudio.



Los mapas individuales que presentan los puntos geográficos de presencia del vector y del virus en la zona de estudio, se muestran en los anexos 5 y 6.

4.2.3 Análisis estadístico

Los datos obtenidos mediante el análisis de ANOVA nos indican que no existe una relación entre la presencia del virus del Dengue y el área de colecta, obteniendo valores de $p\text{-value}= 0.114$ y $\alpha= 0,05$. La relación entre el mes de captura y la presencia del virus nos arroja un valor de $p\text{-value}= 0.08$ con un $\alpha= 0,05$ (anexo 8: Resultados del análisis de ANOVA en el software Minitab y anexo 9: Tabla de individuos analizados por área de colecta), indicando que no existe relación entre las dos variables. Este análisis puede verse influenciado por el esfuerzo de muestreo realizado en cada mes independientemente; y con el número de muestras colectadas y analizadas lo que significaría una baja confiabilidad del análisis y su interpretación.

4.3 Discusión

El presente estudio estuvo marcado por dos ambientes de análisis bien diferenciados; el primero siendo parte de la base del estudio, corresponde a la fase de trabajo de campo que fue realizado en la Cooperativa de Vivienda Provincias Unidas ubicado en la ciudad de Santo Domingo en la provincia de Santo Domingo de los Tsáchilas en el Ecuador. Durante el periodo de muestreo cabe destacar que no se reportaron casos de dengue en la zona, por lo que en principio supondría la ausencia del virus del dengue en los individuos capturados. Adicionalmente, se logró observar que la mayoría de individuos capturados por aspiración en el interior de las viviendas correspondían al género *Culex* y una pequeña cantidad a la especie de interés *Aedes aegypti*. Esto concuerda con los estudios realizados por Guedes y otros (2010), al reportar una abundancia superior de *Culex quinquefasciatus* sobre *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus*, siendo este último una especie no encontrada en la zona de muestreo y no reportada hasta el momento en el territorio ecuatoriano. Es de considerar también que en esta etapa de la investigación se pudo evidenciar que la mayor cantidad de mosquitos capturados se dieron entre las 16h00 y 18h00, esto debido a que el biorritmo de picadura del mosquito presenta uno de sus picos de máxima actividad antes de la puesta del sol (Thiri6n, 2003, págs. 31-32). Dentro de la metodologí3a de muestreo empleada cabe resaltar la importancia de la conservaci6n del tejido del individuo fresco en el reactivo RNAlater y en frí0 a 4°C durante el tiempo de permanencia en campo (cinco días) después de los cuales deben ser congelados a -80°C para asegurar la calidad del material genético para procesos posteriores y evitar la degradaci6n del RNA del virus del dengue que puede estar presente en las muestras colectadas. Como se mencion6 en el capít3ulo 3 correspondiente a la metodologí3a, las muestras obtenidas en campo en el mes de enero fueron conservadas en etanol al 70% bajo las condiciones ya mencionadas con base en los experimentos desarrollados por Cáceres, 2003. Sin embargo, como se puede observar en la figura 14, existe una gran cantidad de muestras que han sufrido degradaci6n, esto evidenciado por la marca de “barrido” en la migraci6n mediante electroforesis en gel de agarosa de los productos de RT-PCR.

Como un segundo ambiente de desarrollo del presente estudio, tenemos la fase de laboratorio que fue realizada en el laboratorio de Biología Molecular de Vectores y en el laboratorio de Diagn6stico e Investigaci6n Microbiol6gica, ambos del Instituto Nacional de Investigaci6n en Salud Pú3blica (INSPI) de la ciudad de Quito. La

metodología de estudios de RNA mediante la aplicación de la reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa, ha sido empleada en una gran cantidad de publicaciones con resultados satisfactorios gracias a su sensibilidad, eficiencia y en la mayoría de los casos, por su rapidez para la obtención de resultados. Sin embargo es importante considerar ciertos aspectos principalmente en los procesos de estandarización de los programas de RT-PCR y del proceso de extracción del material genético para realizar los análisis del virus del dengue a nivel de individuo; de igual manera es relevante considerar la disponibilidad de equipos, reactivos, recursos e instalaciones para el fin.

La mayoría de las publicaciones disponibles referentes al estudio de los serotipos virales del dengue presentes en las poblaciones del vector *Aedes aegypti*, los cuales han sido empleados como base para la realización de este estudio, se han centrado en el procesamiento de las muestras agrupándolos en pools de varios individuos (Cáceres, 2003, pág. 157) (De la Mora, Jiménez, & Treviño, 2010, pág. 128) (Harris, y otros, 1998, pág. 2634) (Liotta, Cabenne, & Tonon, 2000, pág. 49) (Urdaneta, y otros, 2005, pág. 178), para la extracción del RNA, sin embargo Urdaneta y otros (2005), plantean la metodología de extracción de RNA a partir de individuos siguiendo las mismas condiciones empleadas en los pools. Actualmente, se pueden encontrar en el mercado una gran variedad de kits comerciales para la extracción de RNA total y RNA viral, mismos que presentan muchas ventajas en comparación con los métodos de extracción “manuales” que resultan más económicos pero que representan una mayor inversión de tiempo tanto en la estandarización de la metodología como en la calidad del extracto de material genético obtenido; pero cuyo desempeño, reproductibilidad y aplicabilidad al estudio de nuestro interés no resulta adecuado o no ha sido comprobado.

Tal es el caso del kit RNAqueous® Micro kit (AM1931) de la marca Ambion de Life Technologies aplicado en el presente estudio, que está diseñado para la obtención de material genético a partir de tejidos de pequeño tamaño que según lo indicado por el fabricante del kit, tiene eficiencia con tejidos con un peso menor o igual a 10 miligramos (Life Technologies, 2010), lo que resultaría ideal para el estudio del virus en un mosquito cuyo peso oscila entre 0,5 a 2,8 miligramos (Urdaneta, y otros, 2005, pág. 178). Es importante considerar también que resultó necesario efectuar algunas modificaciones a lo establecido por el kit; principalmente el mantenimiento de las muestras en frío durante todo el proceso de extracción y la aplicación de volúmenes

mayores a lo recomendado tanto el paso de lisis, como en los lavados y en la elución final para la purificación del material genético; esto con la finalidad de obtener la mayor cantidad posible de RNA total y principalmente para conservar sin alteraciones el RNA del virus del dengue que representaría una pequeña parte del RNA total obtenido.

Se logró identificar tres serotipos del virus del dengue en el área: DENV-1, DENV-2 y DENV-3; siendo el más prevalente el serotipo DENV-2. Según información presentada en el Boletín Epidemiológico N°39 de la situación de dengue en el Ecuador 2013, se ha reportado únicamente el serotipo DENV-2 en pacientes de la provincia de Santo Domingo de los Tsáchilas (Ministerio de Salud Pública, 2013). Es importante considerar que se tuvieron que modificar en algunos casos, los tiempos de exposición de la cámara del fotodocumentador y las gamas de color para poder apreciar las bandas obtenidas con mayor claridad; esto es debido a la baja concentración de partículas virales en un mosquito y en consecuencia a la baja concentración de RNA viral en los extractos. La presencia de dímeros de primers y marcas de corrida en los geles producto, fueron un problema para apreciar las bandas positivas; pese a que se realizaron modificaciones en la concentración de los cebadores, la imagen revelada de los geles no presentaron gran diferencia, por lo que la concentración de los primers no es la causa para la aparición de estas marcas, sino el diseño de la secuencia de los primers y su hibridación en sí mismos en el programa de amplificación.

La eficiencia de una reacción de RT-PCR puede estar determinada por la presencia de estructuras y a la concentración de RNA presente en la muestra, ya que un exceso de RNA puede inhibir la reacción mientras que una baja concentración resulta en una pobre resolución y apreciación de la banda en el gel de agarosa; en este punto resulta complicado determinar la concentración de RNA viral presente en un extracto de RNA total que fue lo que se empleó en este estudio. Hay que considerar que en metodologías manuales tanto de extracción de RNA como de RT-PCR, se ha evidenciado la presencia de inhibidores en los mosquitos que actúan con la enzima y afectan a la reacción de RT-PCR (Chungue, Roche, Lefevre, Barbazan, & Chanteau, 1993).

Resulta interesante observar en las muestras E20-1, F1-1 y M3-1, una banda de un tamaño intermedio entre los serotipos DENV-2 y DENV-3; los análisis de esta banda después de haber comprobado la homología de los cebadores empleados a la región de

interés en el genoma y la no-homología a otras regiones, dan lugar a la formulación de dos hipótesis: una de ellas explicaría una inserción o deleción en el fragmento al que se unen los cebadores, produciendo copias de mayor peso que el DENV-2 o a su vez de menor peso que el DENV-3. La otra hipótesis manifiesta la posibilidad de un nuevo serotipo del virus del dengue, posiblemente el DENV-5 de reciente descubrimiento (Organización Panamericana de la Salud, 2010).

Autores como Kow Chung & Yin Pang (2002); De la Mora, Jiménez, & Treviño (2010); Chow y otros (1998); y Urdaneta y otros (2005), han realizado estudios similares principalmente analizando los serotipos virales en pools de mosquitos, siendo Urdaneta y otros (2005), quién realizó estudios con individuos además de pools. Sus reportes de porcentaje de presencia del virus del dengue han sido muy variados siendo: 6,91%, 14%, 43,5% y 14% respectivamente; siendo en el caso del presente estudio un porcentaje de 24,48% de individuos positivos. Se debe considerar que los autores antes citados realizaron muestreos durante varios años, teniendo a su disposición un gran número de muestras, que en comparación con las 49 muestras obtenidas durante los meses de enero a abril de 2014 en el área de estudio, no corresponden a una muestra significativa de la población del vector *Aedes aegypti*, que represente su comportamiento. Sin embargo es de resaltar el desarrollo de la metodología de análisis, que puede ser aplicable a estudios de diversas enfermedades transmitidas por vectores artrópodos a nivel de individuo con buenos resultados.

De los resultados obtenidos a partir de los ensayos se puede determinar que el serotipo viral más prevalente en el área de estudio, es el serotipo DENV-2; aunque se evidenció la presencia de los serotipos DENV-1 y DENV-3. Estos análisis nos llevan a la aceptación de la hipótesis de la investigación que plantea la presencia de más de un serotipo viral circulante en la población de insectos vectores en la zona. A partir de los mapas obtenidos mediante el software QGIS 2.6.1, se puede observar que tanto el vector *Aedes aegypti* como el virus del dengue, presentaron una amplia distribución en el área de estudio, resaltando la presencia, hasta por tres meses seguidos del vector en dos puntos principales al noroeste y suroeste del mapa. Por otra parte, se pudo evidenciar que la presencia del virus del dengue no fue documentada más de una vez en un mismo lugar, por el contrario presentó una amplia distribución por el área.

El análisis de los datos mediante una prueba de ANOVA demostró que no existe relación entre la presencia del virus del dengue con la zona de colecta ni el mes de captura; el número de individuos analizados puede ser la principal causa para no poder establecer con certeza una relación de la presencia del virus con cualquiera de las dos variables independientemente.

CONCLUSIONES

En la fase de trabajo de campo durante la aspiración de individuos adultos en el interior de las viviendas, se pudo observar la presencia de individuos del género *Culex* en mayor abundancia que los de la especie *Aedes aegypti*.

La aplicación del reactivo RNAlater Tissue Collection: RNA Stabilization Solution, demuestra un comportamiento eficiente en el mantenimiento y conservación del RNA de los tejidos conservados en campo y posteriormente en laboratorio.

La aplicación del kit de extracción de RNA total RNAqueous-Micro kit Micro Scale RNA Isolation Kit nos da como resultado un RNA total de buena calidad y adecuada concentración para la realización de ensayos por RT-PCR de los individuos en estudio.

El kit SuperScript® III One-Step RT-PCR System with Platinum® Taq DNA Polymerase, resulta una elección satisfactoria al momento de realizar ensayos mediante RT-PCR, ya que nos permite la ejecución de los procesos de transcripción inversa y amplificación del cDNA sintetizado a partir de RNA, en un mismo vial de reacción y en un solo programa en el termociclador.

En base al ensayo realizado en la estandarización del programa de RT-PCR, se logró concluir que a mayores temperaturas de annealing, el serotipo DENV-4 pierde definición.

El tiempo empleado en la migración electroforética en gel de agarosa de los productos de RT-PCR al voltaje empleado en el presente estudio, varía en función del tamaño del gel; puesto que un gel pequeño de un volumen de 50mL., corre por un tiempo de una hora mientras que un gel de 200mL. de volumen, necesita aproximadamente dos horas para completar la migración.

El serotipo DENV-2 fue el que presentó una mayor prevalencia en la población de mosquitos vectores *Aedes aegypti* en el área de estudio. Esto concuerda con los informes de casos de dengue en la ciudad de Santo Domingo de los Tsáchilas, donde se ha reportado únicamente la presencia de este serotipo, presentando para el año 2013 su presencia en 10 de las 15 provincias donde se han generado reportes, seguido por el DENV-1 que estuvo presente en 5 de las 15 provincias.

Se pudo observar a partir de la información obtenida en el muestreo en campo, que la población de *Aedes aegypti* en el área de estudio tuvo una disminución significativa;

esto debido a que se realizan controles de criaderos de fases inmaduras de culícidos en cada visita técnica a la zona.

A partir de los análisis de los mapas se determinaron dos puntos de mayor hacinamiento de la población de *Aedes aegypti* en el área de estudio, uno al nor-oeste y otro al sur-oeste mostrando su presencia hasta por tres meses seguidos. El mes de mayor abundancia del vector corresponde al mes de febrero de 2014, coincidiendo con el mayor número de individuos hembras del mosquito infectados con el virus del dengue.

El análisis estadístico de ANOVA demostró que no existe una relación significativa entre la presencia del virus del dengue con el área de colecta y el mes de captura en los individuos analizados. Posiblemente el tamaño de muestra empleado en el presente estudio sea la causa por la cual no se pueda definir con un adecuado nivel de certeza, la significancia de este análisis.

RECOMENDACIONES

Empleo de kits comerciales de extracción exclusivos para obtención de RNA viral a partir de muestras de tejidos para el estudio en cuestión.

Realizar un ensayo para la determinación del nivel de sensibilidad del programa de RT-PCR empleando los controles positivos de cada serotipo viral, con una concentración conocida de unidades formadoras de placas (PFU) por microlitro de control para obtener resultados más informativos.

Aplicación de técnicas moleculares más objetivas como la Real Time RT-PCR para la obtención de resultados cuantitativos que nos permita determinar conclusiones más precisas a partir de los datos obtenidos.

Emplear un mayor número de muestras para el análisis, para poder determinar con mayor certeza el grado de relación entre la presencia del virus del dengue con la zona de colecta y mes de captura.

SIGLAS Y ACRÓNIMOS

RT-PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa con Transcripción Inversa.

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa.

OMS: Organización Mundial de la Salud.

OPS/PAHO: Organización Panamericana de la Salud / Panamerican Health Organization.

CDC: Center for Disease Control and Prevention.

TDR: Programa Especial para Investigación y Capacitación en Enfermedades Tropicales

INSPI: Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública del Ecuador

SNEM: Servicio Nacional de Erradicación de la Malaria / Servicio Nacional de Control de Enfermedades Transmitidas por Vectores Artrópodos.

MSP: Ministerio de Salud Pública del Ecuador

DENV: Virus del dengue.

prM: Proteína precursora de membrana (en la estructura del virus del dengue).

M: Proteína de Membrana (en la estructura del virus del dengue).

E: Proteína de la envoltura (en la estructura del virus del dengue).

SENESCYT: Secretaría Nacional de Educación Superior, Ciencia, Tecnología e Innovación del Ecuador.

SATVEC: Sistema de Alerta Temprana para el Control de Vectores.

DIGESA: División de Vigilancia de Artrópodos y Roedores de Perú

SENEPA: Servicio Nacional de Erradicación del Paludismo de Paraguay

FD: Fiebre por dengue.

FHD: Fiebre Hemorrágica por dengue.

SCD: Síndrome de Choque por dengue.

DENCO: Dengue Control.

RNA: Ácido Ribonucleico.

DNA: Ácido Desoxirribonucleico.

mRNA: RNA mensajero.

GLOSARIO

Criadero: Lugar donde se desarrollan las fases inmaduras de mosquitos.

Arbovirus: Conjunto de virus que son transmitidos por artrópodos (Arthropod borne viruses)

Endémico: Propio y exclusivo de determinadas localidades o regiones.

Epidemia: Enfermedad que se propaga durante algún tiempo por un país, acometiendo simultáneamente a gran número de personas.

Vector: Ser vivo que puede transmitir o propagar una enfermedad.

Pandemia: Enfermedad epidémica que se extiende a muchos países o que ataca a casi todos los individuos de una localidad o región.

Mortalidad: Tasa de muertes producidas en una población durante un tiempo dado, en general o por una causa determinada.

Morbilidad: Proporción de personas que enferman en un sitio y tiempo determinado.

Petequias: Mancha pequeña en la piel, debida a efusión interna de sangre.

Hematocrito: Aparato centrifugador que separa las células sanguíneas del plasma para averiguar su proporción relativa y para realizar otros análisis.

Virión: Unidad estructural de los virus.

Proteasa: Enzima que rompe los enlaces de las proteínas.

Hidrofóbico: Sustancia que no tiene afinidad con el agua.

RNA polimerasa: Enzima capaz de transcribir o replicar RNA.

DNA polimerasa: Enzima capaz de transcribir o replicar DNA.

RNAsas: Enzima que descompone el ARN.

Dnasas: Enzima que descompone el ADN.

Convoluta: Retorcido, arrollado, con una parte sobre otra en forma de rollo.

Traducción: Cambio de la información contenida en la secuencia de los cuatro nucleótidos del ARNm por la debida al ordenamiento de los 20 aminoácidos en la estructura de las cadenas polipeptídicas. Cada aminoácido se une a una pequeña

molécula específica de ARN que sirve para su identificación, denominado ARN de transferencia. Esta molécula transfiere los aminoácidos libres de la solución al punto de formación de las cadenas polipeptídicas cuando está indicado por las instrucciones contenidas en la molécula de ARN mensajero. El proceso tiene lugar en la interacción de los codones del ARNm con la región del anticodon de los aminoacil-ARNt. Se distinguen en ella las etapas de iniciación, elongación y terminación en la que participan diferentes factores proteicos.

Transducción: es un proceso mediante el cual el ADN es transferido desde una bacteria a otra mediante la acción de un virus. También se utiliza para designar al proceso mediante el cual ADN exógeno es introducido en una célula mediante un vector viral. Esta es una herramienta que usualmente utilizan los biólogos moleculares para introducir en forma controlada un gen extraño en el genoma de una célula receptora.

Heterodímero: Proteína compuesta por dos subunidades diferentes.

Transcripción Inversa: proceso empleado en biología molecular para generar una cadena de DNA de doble cadena a partir de RNA de cadena sencilla.

Primer o cebador: es una secuencia de ácido nucleico que sirve como punto de partida para la replicación de DNA.

Serotipo: Categoría en la que se clasifican los microbios o los virus según su reacción en presencia de suero que contiene anticuerpos específicos.

Virus de ARN monocatenario positivo: virus que tiene ácido ribonucleico de cadena sencilla de sentido positivo como material genético y no se replica usando DNA intermedio por lo que pueden ser traducidos inmediatamente por la célula huésped. Su replicación se da en el citoplasma y no es tan dependiente del ciclo celular como los virus de DNA.

Flaviviridae: familia de virus que se propagan principalmente por vectores artrópodos (especialmente garrapatas y mosquitos). Incluye los géneros Flavivirus (Virus de la fiebre amarilla, Virus del Nilo Occidental y el Virus del dengue); Género Hepacivirus (Virus de la hepatitis C); Género Pestivirus (Virus de la diarrea bovina Virus de la peste porcina).

LISTA DE REFERENCIAS

- Acosta, C., & Gómez, I. (2005). Biología y Métodos Diagnósticos de Dengue. *Revista de Biomedicina*, 113-137.
- Acuña, P. (2002). *Determinación de la prevalencia de Dirofilaria Immitis en los distritos de San Martín de Porres, Lima y Rímac*. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos.
- Almirón, W. (2009). *Aedes aegypti. Ficha técnica*. Córdoba: Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales. Universidad Nacional de Córdoba.
- Amunárriz, M., Rios, C., Torres, C., & Solís, M. d. (2009). *Primer brote de dengue en la población de Nuevo Rocafuerte. Aguarico. Orellana. Ecuador. (diciembre 2007 - marzo 2008)*. Quito: Dirección Nacional de Control y Mejoramiento de la Salud Pública. MSP.
- Badii, M., Landeros, J., Cerna, E., & Abreu, J. L. (2007). Ecología e historia del dengue en las Américas. *International Journal of Good Conscience*, 248-273.
- Cabezas, C., Gutiérrez, V., García, M., Mamani, E., Cobos, M., Cáceres, O., . . . Villaseca, P. (2005). Dengue en el Perú: Aportes para su diagnóstico y control. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica*, 212-228.
- Cáceres, O. (2003). Detección rápida de los serotipos del virus dengue en el mosquito *Aedes aegypti*. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 20, 156-158.
- Centers for Disease Control and Prevention. (27 de septiembre de 2012). *Entomology and Ecology*. Recuperado el 4 de enero de 2014, de <http://www.cdc.gov/dengue/entomologyEcology/>
- Centers for Disease Control and Prevention. (2014). *Hoja Informativa sobre Aedes aegypti – (Mosquito de la fiebre amarilla)*. Sacramento: California Department of Public Health.
- Chungue, E., Roche, C., Lefevre, M., Barbazan, P., & Chanteau, S. (1993). Ultra-rapid, simple, sensitive, and economical silica method for extraction of dengue viral RNA from clinical specimens and mosquitoes by reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Journal of Medical Virology*.

- Colvard, J. (1978). El comportamiento alimentario de los mosquitos. *Scientific American*, 86-93.
- De la Mora, A., Jiménez, F., & Treviño, S. (marzo-abril de 2010). Distribución geoespacial y detección del virus del dengue en mosquitos *Aedes (Stegomyia) aegypti* de Ciudad Juárez, Chihuahua, México. *Salud Pública de México*, 52(2), 127-133.
- Domingo, E. (2002). Queasispecies theory in virology. *Journal of Virology*, 463-465.
- Fajardo, Á. (2011). *Variabilidad genética del virus del Dengue en la región sudamericana: Primeros abordajes epidemiológicos frente a una eventual re-emergencia del virus Dengue en Uruguay*. Montevideo: Universidad de la República.
- Gubler, D. J. (1998). Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever. *Clinical Microbiology Reviews*, 480-496.
- Günther, J. (2007). *Detección y tipificación del virus del dengue en el vector Aedes aegypti y en pacientes de regiones endémicas del estado de Oaxaca*. México: Instituto Politécnico Nacional.
- Harris, E., Roberts, G., Smith, L., Selle, J., Kramer, L., Valle, S., . . . Balmaseda, A. (1998). Typing of Dengue Viruses in Clinical Specimens and Mosquitoes by Single-Tube Multiplex Reverse Transcriptase PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 2635.
- Hartanti, M., Suryani, & Tirtadjaja, I. (2010). Dengue virus transovarial transmission by *Aedes aegypti*. *Universa Medicina*, 65-70.
- Hernández, F. (2002). *Fundamentos de Epidemiología. El arte detectivesco de la investigación epidemiológica*. San José: Universidad Estatal a Distancia San José.
- Jaramillo, L. F., & Uriza, L. F. (diciembre de 2005). Uso e Interpretación de Pruebas Diagnósticas. *Revista Colombiana de Radiología*, 16(4), 1853.
- Kourí, G. (2006). El dengue, un problema de salud creciente en las Américas. *Revista Panamericana de Salud Pública*, 143-145.

- Lanciotti, R., Calisher, C., Gubler, D., Chang, G.-J., & Vorndam, V. (1992). Rapid detection and typing of dengue viruses from clinical samples by using reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Journal of Clinical Microbiology*, 546.
- Laredo, S., Guo, X., & Bocanegra, V. (2012). Virus del dengue. Estructura, serotipos y epidemiología molecular. *CienciaUat*, 27-33.
- Lee, H., & Rohani, A. (2005). Transovarial Transmission of Dengue Virus in *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in Relation to Dengue Outbreak in an Urban Area in Malaysia. *Dengue Bulletin*, 106-111.
- Life Technologies. (2010). *RNAqueous-Micro kit Micro Scale RNA Isolation Kit*. California: Life Technologies.
- Life Technologies. (2011). *SuperScript® III One-Step RT-PCR System with Platinum® Taq DNA Polymerase*. California: Life Technologies.
- Liotta, D., Cabenne, G., & Tonon, S. (2000). Extracción, purificación y detección molecular del genoma de dengue tipo 2 en mosquitos *Aedes aegypti*. *Revista de Ciencia y Tecnología*, 47-52.
- Lobo, I. (2011). *Dengue Fever*. Cambridge: NPG Education.
- Mamani, E. (2013). *Identificación de genotipos y linajes de los cuatro serotipos del virus dengue en el Perú durante los años 1998-2012*. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos.
- Maquetti, M. d. (2008). *Aspectos bioecológicos de importancia para el control de Aedes aegypti y otros culicidos en el ecosistema urbano*. Ciudad de la Habana: Editorial Universitaria.
- Ministerio de Salud El Salvador. (2000). *Ficha Técnica-Proyecto Especies Invasoras MARN-IABIN*. San Salvador: Ministerio de Salud.
- Ministerio de Salud Pública. (2012). *Dirección Nacional de Vigilancia Epidemiológica*. Recuperado el 22 de enero de 2014, de <http://public.tableausoftware.com/views/tropicales/CASOSPORPROVINCIA#1>

- Ministerio de Salud Pública. (07 de enero de 2013). *Boletín epidemiológico de la situación del Dengue en el Ecuador, No. 46*. Recuperado el 2 de enero de 2014, de <http://www.salud.gob.ec/boletin-epidemiologico-de-la-situacion-del-dengue-en-el-ecuador-no-46-07-de-enero-de-2013/>
- Ministerio de Salud Pública. (7 de octubre de 2013). *Boletín epidemiológico No. 39 de la situación de Dengue en el Ecuador 2013*. Recuperado el 11 de enero de 2014, de <http://www.salud.gob.ec/boletin-epidemiologico-no-39-de-la-situacion-de-dengue-en-el-ecuador-2013/>
- Ministerio de Salud. Argentina. (2013). *Enfermedades Infecciosas. Dengue. Diagnóstico de Dengue. Guía para el Equipo de Salud*. Buenos Aires: Dirección de Epidemiología - Ministerio de Salud de la Nación.
- Montero, G. (2009). *Biología de Aedes aegypti*. Rosario.
- Montes, T. (2001). Actualización en Dengue. Parte 1. *Revista Sociedad Venezolana de Microbiología*.
- Nelson, M. (1986). *Aedes aegypti: Biología y Ecología*. Washington: Organización Panamericana de la Salud.
- Organización Mundial de la Salud. (1958). *XV Conferencia Panamericana*. Organización Mundial de la Salud, San Juan.
- Organización Mundial de la Salud. (2009). *Dengue. Guías para el diagnóstico, tratamiento, prevención y control*. La Paz: Organización Mundial de la Salud.
- Organización Mundial de la Salud. (diciembre de 2012). *Dengue y Dengue Hemorrágico*. Recuperado el 23 de octubre de 2013, de <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/es/>
- Organización Panamericana de la Salud. (2010). *Boletín Epidemiológico de Córdoba 1240*. Recuperado el 15 de octubre de 2013, de Descubren un nuevo tipo del virus que causa el dengue: <http://www.paho.org/blogs/par/tematico/?p=380>
- Organización Panamericana de la Salud. (2010). *Dengue, Guías de atención para enfermos en la región de las Américas*. La Paz: Organización Panamericana de la Salud.

- Organización Panamericana de la Salud. (2013). Detección de los virus del dengue mediante Reverso Transcripción/Reacción en cadena de la Polimerasa (RT-PCR). *Técnicas de laboratorio para el diagnóstico y caracterización de los virus del dengue*, 88.
- Ortega, L. (2001). Dengue: un problema siempre emergente. *Revistas Médicas Cubanas*, 41-52.
- Perera, R., & Kuhn, R. (2008). *Structural Proteomics of Dengue Virus*. West Lafayette: Current Opinion in Microbiology.
- Real, J., Mosquera, C., Gonzáles, M., Mosquera, C., Regato, M., Calderón, G., . . . Bruno, A. (2012). *Detección del Virus del Dengue en el Ecuador. Una Visión Epidemiológica Período 1988-2012*. Guayaquil: Imprenta INHMT.
- Resino, S. (2006). *Epidemiología Molecular*. Recuperado el 2 de noviembre de 2013, de <http://epidemiologiamolecular.com/Flavivirus/>
- Salman, M. (2009). *Propiedades de las Pruebas Diagnósticas*. Colorado: Colorado State University.
- SATVEC Dengue. (2013). *Sistema Nacional de Vigilancia y Alerta Temprana para el Control de Vectores*. Quito.
- Thirión, J. (2003). *EL Mosquito Aedes aegypti y el Dengue en México*. México D.F.: Bayer Environmental Science.
- Twiddy, S., & Holmes, E. (2003). The extent of homologous recombination in members of the genus Flavivirus. *Journal of General Virology*, 429-440.
- Urdaneta, L., Herrera, F., Pernalet, M., Zoghbi, N., Rubio-Palis, Y., Barrios, R., . . . Salcedo, M. (2005). *Detection of dengue viruses in field-caught Aedes aegypti (Diptera: Culicidae) in Maracay, Aragua state, Venezuela by type-specific polymerase chain reaction*. Maracay: Elsevier.
- Uribarren, T. (2010). *Universidad Nacional Autónoma de México*. Recuperado el 12 de febrero de 2013, de Generalidades del Virus: <http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/virologia/generalidades.html>

Velandia, M., & Castellanos, J. (2011). *Virus del dengue: estructura y ciclo viral*.
Bogotá: Universidad Nacional de Colombia.

ANEXOS

Anexo 1: Estado de la Erradicación del *Aedes aegypti* en las Américas, OMS 1958

RESOLUCION XXXV CSP15.R35 ES

ESTADO DE LA ERRADICACION DEL AÈDES AEGYPTI EN LAS AMERICAS

La XV Conferencia Sanitaria Panamericana,

Teniendo en cuenta que los informes sobre el estado de la erradicación del Aèdes aegypti correspondientes a Belice, Bolivia, Brasil, Ecuador, Guayana Francesa, Nicaragua, Panamá, Paraguay, Perú, Uruguay y Zona del Canal, presentados en esta Conferencia, según los cuales dichos países y territorios se declaran libres de Aèdes aegypti, después de haberse cumplido satisfactoriamente las normas en que se basan los criterios establecidos por la Oficina Sanitaria Panamericana a este fin,

RESUELVE:

Aceptar los informes presentados en los que se declara que Belice, Bolivia, Brasil, Ecuador, Guayana Francesa, Nicaragua, Panamá, Paraguay, Perú, Uruguay y Zona del Canal, han quedado libres de Aèdes aegypti y hacer un llamamiento a los demás países y territorios, todavía infestados, a fin de que intensifiquen sus actividades anti-aegypti en los términos de la resolución aprobada en la XI Conferencia Sanitaria Panamericana de Río de Janeiro.

(Aprobada en la décimotercera sesión plenaria, celebrada el 2 de octubre de 1958)

Anexo 2: Planilla de colección de individuos adultos en campo. Proyecto SATVEC



INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIÓN EN SALUD PÚBLICA "INSP"
 PROYECTO "Sistema Nacional de Vigilancia y Alerta Temprana para el Control de los Vectores de Dengue, Malaria y Leishmaniasis"



FORMATO 05: REGISTRO DE COLECCIÓN DE ADULTOS EN CAMPO

Código de Subcircuito: <input type="text"/>	Código de Colección: ECU-_____/_____/_____/_____/_____/_____ COD. PROV / CIUDAD / CIRCUITO / SUBCIRCUITO / N° MUESTRA	_____/_____/_____ Provincia / Cantón / Localidad
FECHA DE COLECTA:		HORA DE COLECTA:
COLECTORES:		
AMBIENTE GENERADO DOMINANTE: <input type="checkbox"/> URBANO <input type="checkbox"/> RURAL <input type="checkbox"/> OTRO		

INFORMACIÓN GEOGRÁFICA	
Código equipo GPS:	
Coordenadas GPS:	
Longitud (X)	Latitud (Y)
<input type="text"/>	<input type="text"/>
Altura (msnm)	
<input type="text"/>	<input type="text"/>

INFORMACIÓN CLIMÁTICA				
Humedad Relativa (%)	Temperatura (°C)	Viento	Nubes	Lluvia
<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="checkbox"/> Alto <input type="checkbox"/> Medio <input type="checkbox"/> Bajo <input type="checkbox"/> Ausente	<input type="checkbox"/> Alto <input type="checkbox"/> Medio <input type="checkbox"/> Bajo <input type="checkbox"/> Ausente	<input type="checkbox"/> Alto <input type="checkbox"/> Medio <input type="checkbox"/> Bajo <input type="checkbox"/> Ausente

MÉTODO DE COLECTA			
CDC	TRAMPA	ASPIRADOR	CEBO
<input type="checkbox"/> Luz Normal <input type="checkbox"/> Luz UV <input type="checkbox"/> CO2 <input type="checkbox"/> Mixto(Luz/CO2)	<input type="checkbox"/> BG Cepstral <input type="checkbox"/> Shannon	<input type="checkbox"/> Mochila <input type="checkbox"/> Manual	<input type="checkbox"/> Humano <input type="checkbox"/> Animal Cuál: _____

UBICACIÓN DE LA COLECCIÓN		
DENTRO DE LA VIVIENDA	AL AIRE LIBRE	DISTANCIA HABITADA CASA MÁS CERCANA
<input type="checkbox"/> Dormitorio <input type="checkbox"/> Sala <input type="checkbox"/> Cocina <input type="checkbox"/> Comedor <input type="checkbox"/> Baño Otro: _____	<input type="checkbox"/> Pabó <input type="checkbox"/> Criadero de animales <input type="checkbox"/> Cultivos <input type="checkbox"/> Bosque Otro: _____	<input type="checkbox"/> menos de 10 metros <input type="checkbox"/> 10-100 metros <input type="checkbox"/> más de 100 metros

VEGETACIÓN ALEDAÑA (100m a la redonda)
<input type="checkbox"/> Bosque Primario <input type="checkbox"/> Bosque Secundario <input type="checkbox"/> Pastizales <input type="checkbox"/> Arbustos <input type="checkbox"/> Ninguno

OBSERVACIONES:	_____

FOTOS:	_____
DESDE:	<input type="text"/>
HASTA:	<input type="text"/>

Anexo 3: Manual de procedimiento para el alineamiento de los cebadores D1, TS1, TS2, TS3 y DEN4, con los genomas de los cuatro serotipos del virus del dengue.

Para evaluar el nivel de especificidad de los cebadores empleados para el estudio de los serotipos del virus del dengue en el vector *Aedes aegypti*, se realizó la alineación de estos en cada uno de los genotipos del virus en la página del National Center for Biotechnology Information (NCBI) como se detalla a continuación:

Ingresar a la página: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

Seleccionar la base de datos de “Genome” y en el cuadro de búsqueda insertar: Dengue virus; aparecerá la siguiente pantalla con toda la información disponible incluyendo los “RefSeq” de cada serotipo del virus.

The screenshot shows the NCBI Genome database search results for 'Dengue virus'. The search bar at the top contains 'dengue virus' and the 'Genome' database is selected. The results page displays the following information:

- Organism Overview:** Dengue virus overview. ID: 10308. Tools: Genome Resource.
- Lineage:** Viruses[3914]; ssRNA positive-strand viruses, no DNA stage[376]; Flaviviridae[59]; Flavivirus[41]; Dengue virus group[1]; Dengue virus[1].
- Sequence data:** genome assemblies: 4.
- Publications:** 1. Genetic characterization of newly reintroduced dengue virus type 3 in Martinique (French West Indies). Feyrefitte CN, et al. J Clin Microbiol 2003 Nov. 2. Attenuation and immunogenicity in humans of a live dengue virus type-4 vaccine candidate with a 30 nucleotide deletion in the 3'-untranslated region. Durbin AP, et al. Am J Trop Med Hyg 2001 Nov. 3. Construction of infectious cDNA clones for dengue 2 virus: strain 10681 and its attenuated vaccine derivative, strain PDK-53. Kinney RM, et al. Virology 1997 Apr 14.
- Search details:** "Dengue virus" [Organism]

The results are organized into four sections, each with a table of RefSeq entries:

- Dengue virus 2:** Submitter: NCBI, Status: Complete, Human Pathogen, BioProjects: PRJNA20183. Table with columns: Type, Name, RefSeq, INSDC, Size (Kb), GC%, Protein, Gene.
- Dengue virus 4:** Submitter: NIAID, LID, USA, Bethesda, Status: Complete, Human Pathogen, BioProjects: PRJNA15599. Table with columns: Type, Name, RefSeq, INSDC, Size (Kb), GC%, Protein, Gene.
- Dengue virus 3:** Submitter: NCBI Genome Project, Status: Complete, Human Pathogen, BioProjects: PRJNA15598. Table with columns: Type, Name, RefSeq, INSDC, Size (Kb), GC%, Protein, Gene.
- Dengue virus 1:** Submitter: NCBI Genome Project, Status: Complete, Human Pathogen, BioProjects: PRJNA15306. Table with columns: Type, Name, RefSeq, INSDC, Size (Kb), GC%, Protein, Gene.

Pantalla del NCBI para la base de datos de genomas del virus del dengue

A continuación seleccionamos el “RefSeq” de cada serotipo del virus obteniendo una pantalla con toda la información del serotipo.

En la parte derecha de la pantalla, tenemos una lista de opciones con el título: “Analyze this sequence”; seleccionamos la opción “Pick Primers”

The screenshot shows the NCBI GenBank entry for Dengue virus 1, complete genome (NC_001477.1). The main content area displays the FASTA sequence and various annotations including LOCUS, DEFINITION, ACCESSION, VERSION, DBLINK, KEYWORDS, SOURCE, ORGANISM, REFERENCE, AUTHORS, TITLE, JOURNAL, PUBMED, and COMMENT. A sidebar on the right contains several sections: 'Change region shown', 'Customize view' (with 'Basic Features' and 'Display options' sub-sections), 'Analyze this sequence' (with 'Run BLAST' and 'Pick Primers' options), 'Dengue Virus Variation', and 'Articles about the DV1_gp1 gene'. A blue box highlights the 'Pick Primers' option in the 'Analyze this sequence' section.

Pantalla del NCBI con información del genoma del DENV-1

En la siguiente pantalla se insertará en “Primer Parameters”, la secuencia de los cebadores para cada serotipo del virus; el cebador D1 actúa como forward en todos los serotipos, mientras que los cebadores TS1, TS2, TS3 y DEN4 actúan como reverse para cada serotipo específico.

The screenshot shows the NCBI Primer-BLAST tool interface. The 'PCR Template' section contains the accession number NC_001477.1. The 'Primer Parameters' section shows the forward primer sequence TCAATATGCTGAAACGGCGAGAAACC and the reverse primer sequence CGTCTCAGTGATCCGGGGG. Other parameters include PCR product size (70-1000), number of primers to return (10), and primer melting temperatures (Tm) (57.0-63.0).

Pantalla del NCBI para alineación de cebadores con el genoma del DENV-1

A continuación se selecciona la opción “Get Primers” al final de la pantalla, lo que dará lugar a la aparición de una nueva con la información necesaria para determinar la especificidad de los cebadores empleados.

Primer-BLAST Primer-Blast results

► NCBI Primer-BLAST : results: Job id=68SxxzItemOU7pd6304I_Beij1JQ2c3 [more...](#)

Input PCR template NC_001477.1 Dengue virus 1, complete genome
Range 1 - 10735
Specificity of primers Primer pairs are specific to input template as no other targets were found in selected database: NCBI Chromosome Sequences (Organism limited to Dengue virus)
Other reports [Search Summary](#)

Search parameters and other details	
Number of Blast hits analyzed	138
Entrez query	
Min total mismatches	2
Min 3' end mismatches	2
Defined 3' end region length	5
Mismatch threshold to ignore targets	6
Misprimed product size deviation	4000
Max number of Blast target sequences	50000
Blast E value	30000
Blast word size	7
Max candidate primer pairs	500
Min PCR product size	70
Max PCR product size	1000
Min Primer size	15
Opt Primer size	20
Max Primer size	25
Min Tm	57
Opt Tm	60
Max Tm	63
Max Tm difference	3
Repeat filter	AUTO
Low complexity filter	Yes

Graphical view of primer pairs

NC_001477.1: 1-11K (11Kbp) | Find | Tools | Configure | ?

Template 1K 2K 3K 4K 5K 6K 7K 8K 9K 10K

Gene# NP_859433.1 DENV_1

Primer pairs for job u68SxxzItemOU7pd6304I_Beij1JQ2c3

Primer 1

Detailed primer reports

Primer pair 1

	Sequence (5'→3')	Template strand	Length	Start	Stop	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	TCAATATGCTGAAACGGCGGAGAAACCG	Plus	28	132	159	68.16	50.00	6.00	2.00
Reverse primer	CGTCTCAGTGATCCGGGGG	Minus	19	613	595	61.79	68.42	5.00	1.00
Product length	482								

Products on intended target

>NC_001477.1 Dengue virus 1, complete genome

product length = 482

```

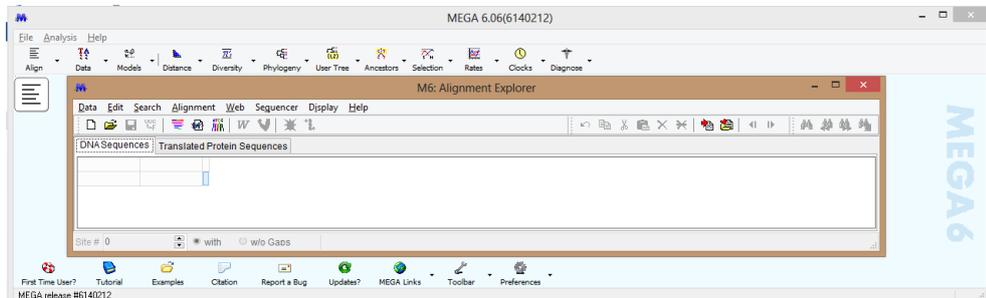
Forward primer 1 TCAATATGCTGAAACGGCGGAGAAACCG 28
Template        132 ..... 159
Reverse primer 1 CGTCTCAGTGATCCGGGGG 19
Template        613 ..... 595
  
```

Pantalla del NCBI con la información resultante del alineamiento de cebadores con el genoma del DENV-1

En el caso del serotipo DENV-1 obtenemos un resultado satisfactorio ya que nos menciona que los cebadores tienen una unión específica en el genoma del virus lo que reduce la posibilidad de uniones inespecíficas en la reacción de RT-PCR. El tamaño de banda a esperarse para el serotipo DENV-1 será de 482 pb (pares de bases).

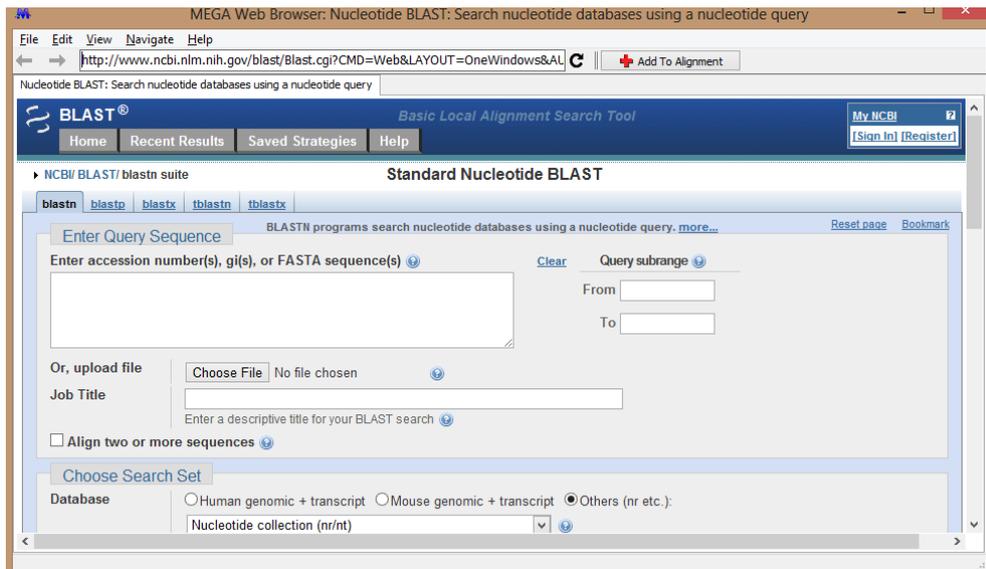
El alineamiento de los cebadores para el serotipo DENV-2, DENV-3 y DENV-4, se lo realizó empleando el software “MEGA 6.0” y la herramienta de “Pick Primers” del NCBI.

En el software “MEGA 6.0” se selecciona el botón de “Align” y se escoge la opción “Edit/Build Alignment”. Se selecciona la opción “Create a new alignment” y se presiona el botón “DNA” en el cuadro de dialogo que se presenta. Se obtendrá la siguiente pantalla:



Pantalla del software “MEGA 6.0” con la ventana de “Alignment Explorer” para alineamiento de secuencias.

A continuación, en la pestaña “Web” se selecciona la opción “Do Blast Search”. Se obtendrá la siguiente pantalla:



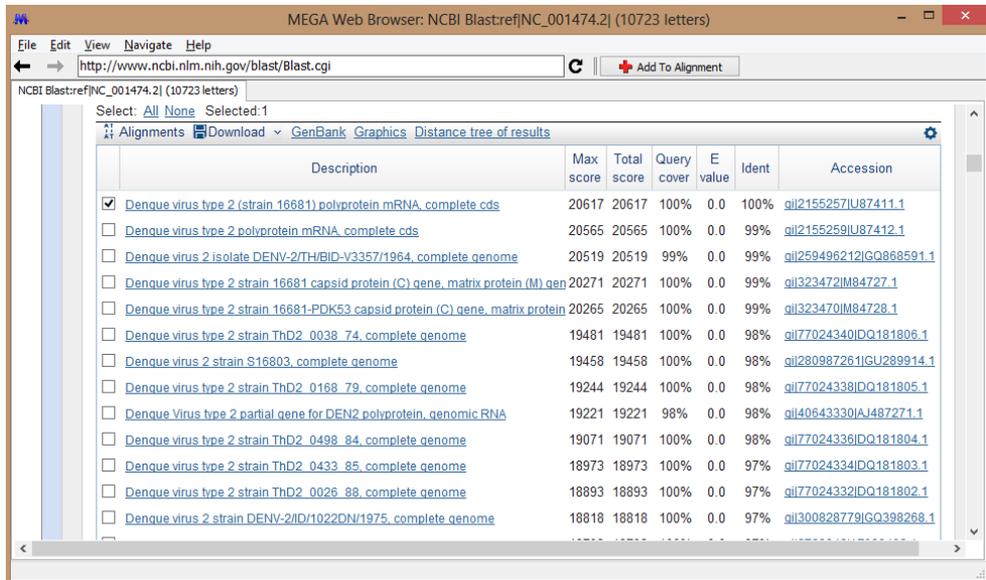
Pantalla del software “MEGA 6.0” para realizar búsqueda en Blast.

En el espacio de ingreso de número de acceso o secuencia en formato FASTA (Enter accesión number(s), gi(s), or FASTA sequence(s)), se ingresa individualmente los números de acceso de cada serotipo como se plantea a continuación:

- DENV-2: NC_001474.2
- DENV-3: NC_001475.2

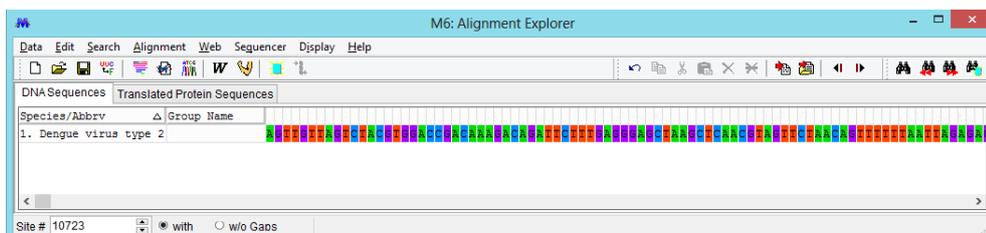
- DENV-4: NC_002640.1

A continuación se selecciona el botón “BLAST”, y en el cuadro que se presenta se selecciona la opción del genoma del serotipo de interés que presenta mayor cobertura (Query cover). Esta secuencia se agregará al alineamiento (Add to Alignment):



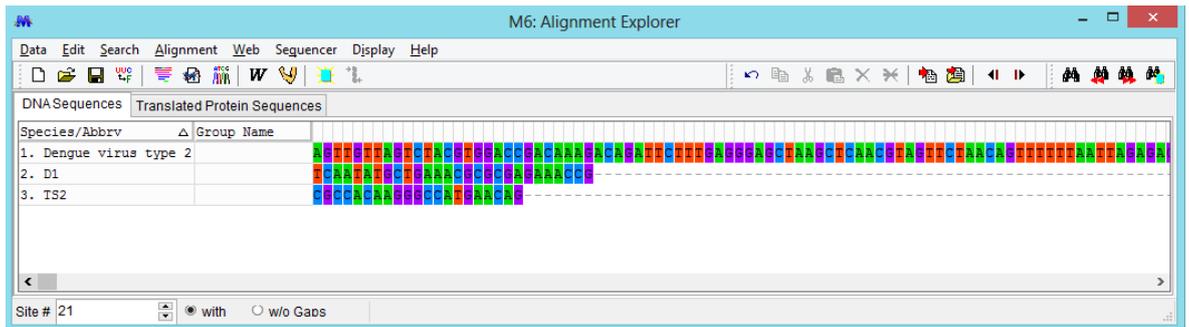
Pantalla del software “MEGA 6.0” para selección de genoma para alineamiento de secuencias.

Al agregar el genoma al alineamiento, se obtuvo la siguiente pantalla:



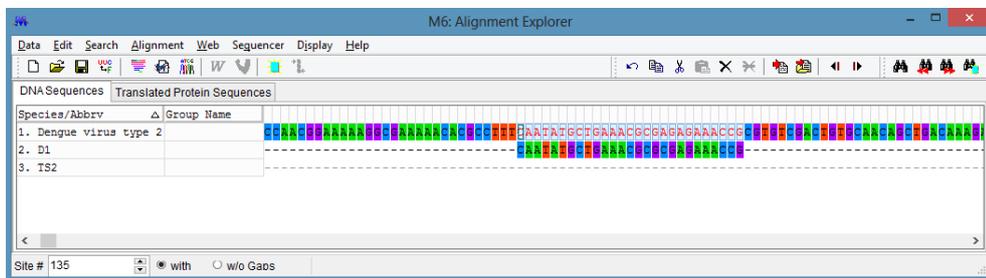
Pantalla del software “MEGA 6.0” con la secuencia del DENV-2.

A continuación en la pestaña “Edit” se selecciona la opción “Insert BlanK Sequence” y se pega las secuencias que se quieren alinear al genoma (D1 como cebador forward para todos los serotipos del virus y TS2, TS3 y DEN4 como cebador reverse):



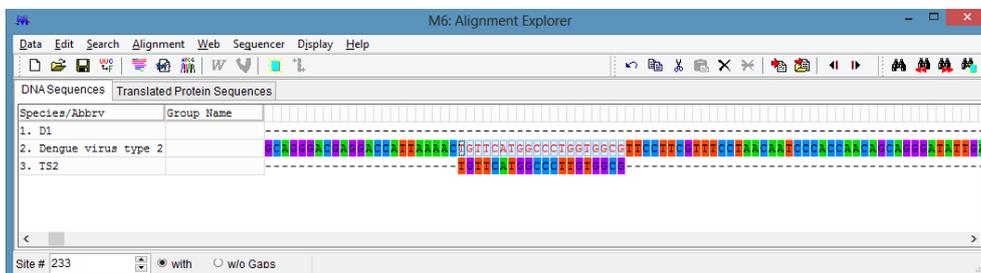
Pantalla del software “MEGA 6.0” con el genoma del serotipo DENV-2 y las secuencias de los cebadores D1 y TS2.

Posteriormente se seleccionan el genoma del serotipo del virus y el cebador forward (D1) y en la pestaña “Alignment” se selecciona la opción “Align by ClustalW”; se aceptan los valores predeterminados y se obtiene el siguiente resultado:



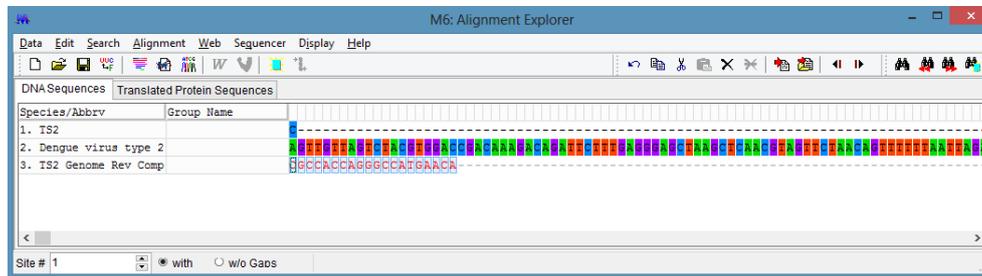
Pantalla del software “MEGA 6.0” con el producto de la alineación del serotipo DENV-2 con el cebador D1.

A continuación se copia la secuencia del genoma correspondiente al cebador alineado (CAATATGCTGAAACGCGAGAGAAACCG) y se lo pega en la pantalla del NCBI en la opción “Pick Primers” para el serotipo de interés en el espacio del cebador forward. En el caso del cebador reverse (TS2), primero se debe realizar el “Reverse complement” antes de la alineación con el genoma; se obtendrá el siguiente resultado:



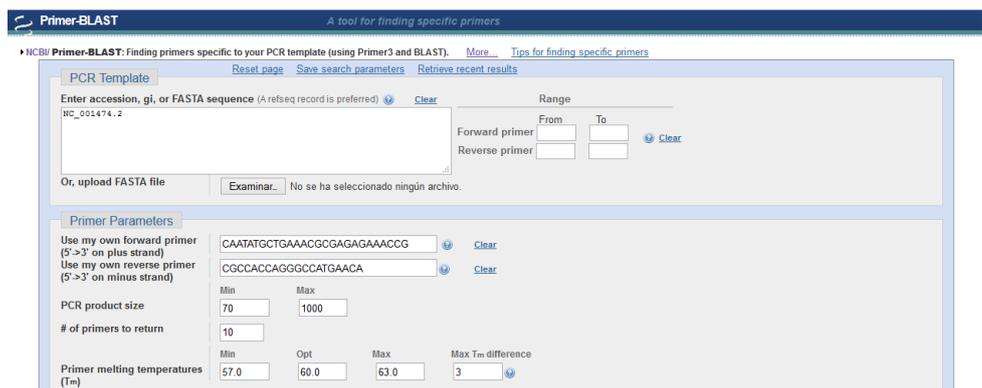
Pantalla del software “MEGA 6.0” con el producto de la alineación del cebador TS2 (reverse complement) con el genoma del serotipo DENV-2.

La secuencia del genoma correspondiente al cebador alineado se copia y se pega en una nueva secuencia ingresada en el mismo archivo; se realiza “Reverse Complement” obteniendo el siguiente resultado:



Pantalla del software “MEGA 6.0”. Resaltado el producto del reverse complement de la secuencia del genoma correspondiente al cebador TS2 alineado al genoma del DENV-2

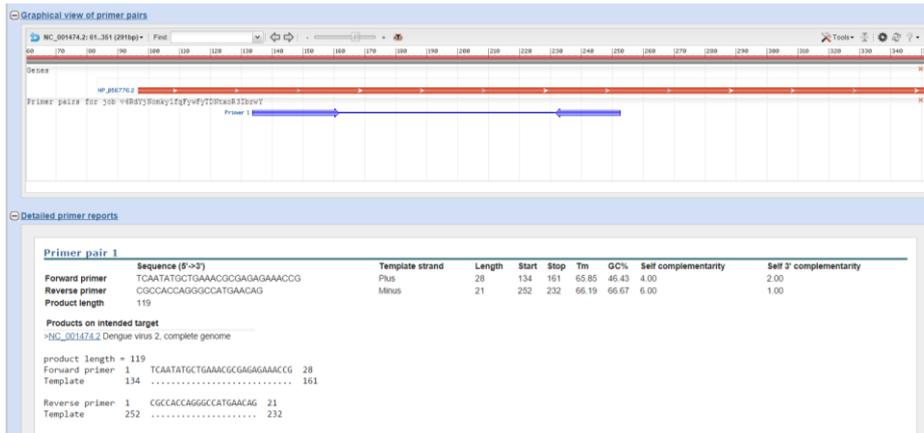
La secuencia obtenida (CGCCACCAGGGCCATGAACA) se pega en la pantalla del NCBI en la opción “Pick Primers” para el serotipo de interés en el espacio del cebador reverse como se muestra a continuación:



Pantalla del NCBI con en número de referencia del serotipo DENV-2 y las secuencias de los cebadores D1 y TS2 obtenidos por la alineación en el software “MEGA”.

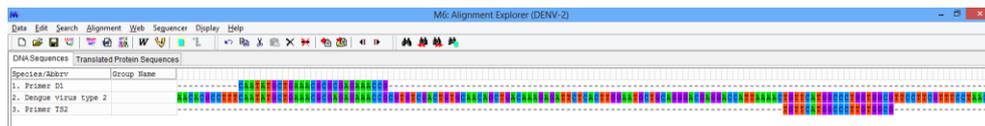
Se selecciona la opción “Get Primers” al final de la pantalla y se obtendrá la siguiente información:





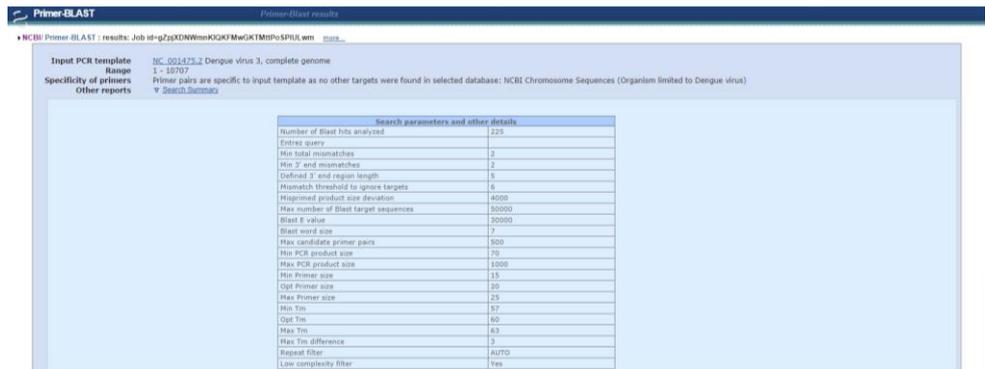
Pantalla del NCBI con la información de los cebadores empleados para la amplificación por RT-PCR del serotipo DENV-2.

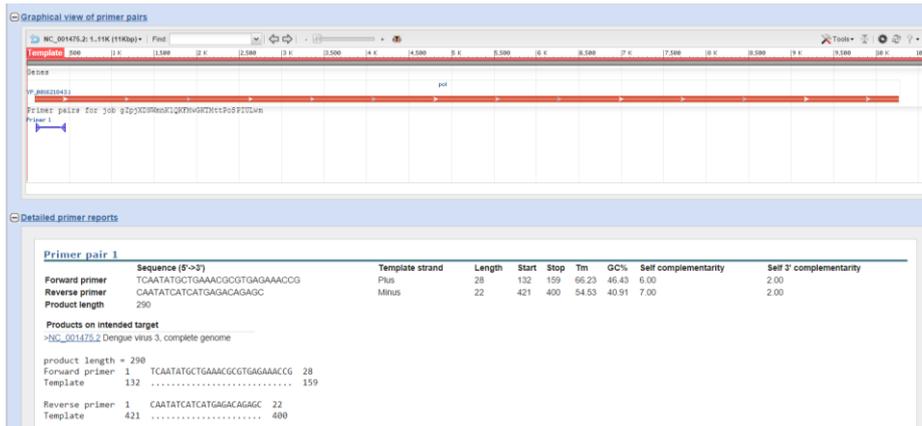
Los análisis de los cebadores empleados para la determinación del serotipo DENV-2, muestran una alta especificidad con un tamaño de fragmento amplificado de 119 pb que concuerda con lo citado por la literatura.



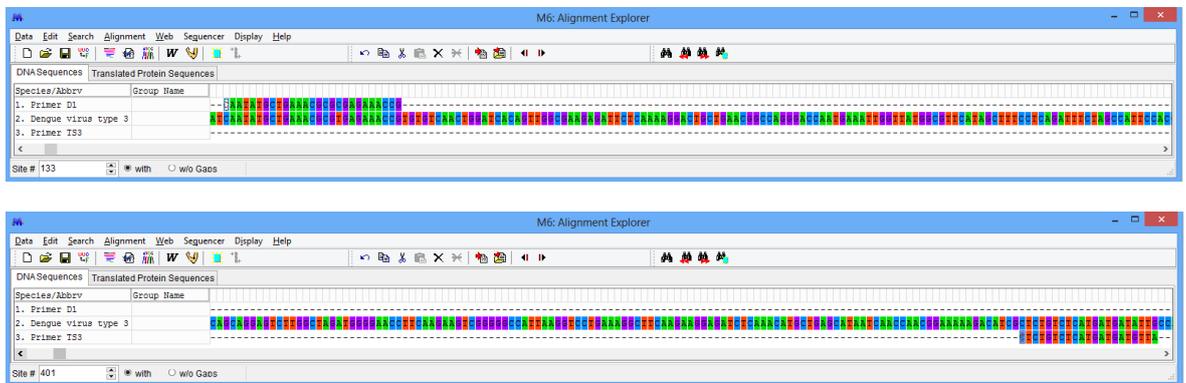
Pantalla del software “MEGA 6.0” con el producto del alineamiento de los cebadores D1 y TS2 con el genoma del serotipo DENV-2.

El mismo proceso fue realizado con los pares de cebadores para el serotipo DENV-3 y DENV-4:



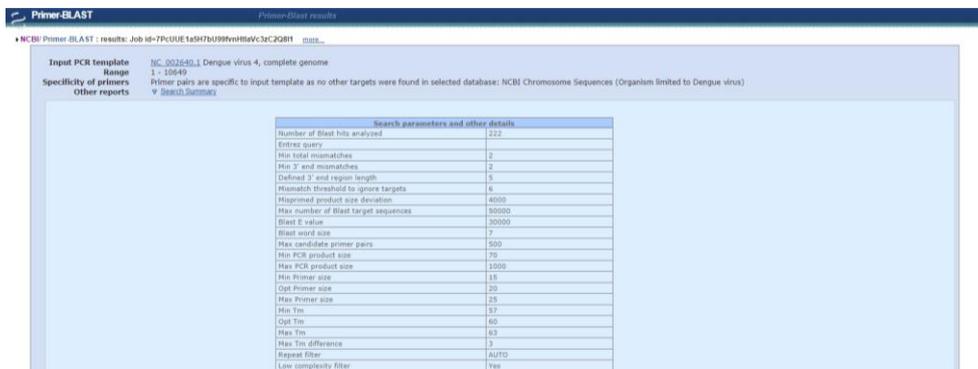


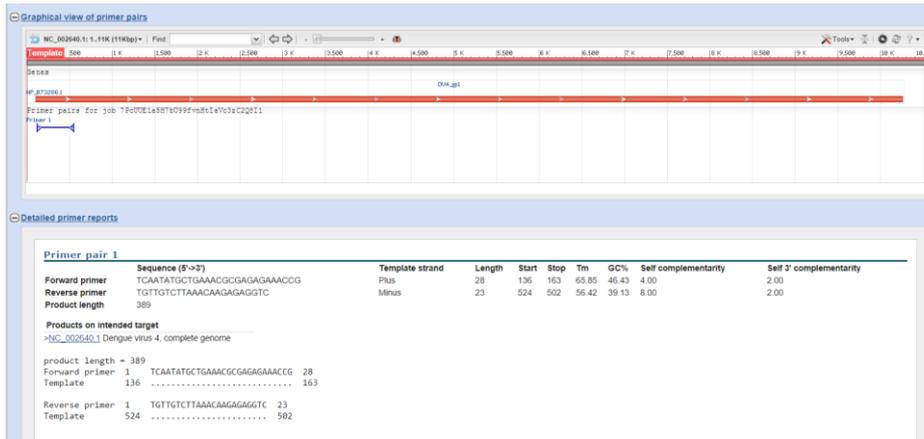
Pantalla del NCBI con la información de los cebadores empleados para la amplificación por RT-PCR del serotipo DENV-3.



Pantalla del software “MEGA 6.0” con el producto del alineamiento de los cebadores D1 y TS3 con el genoma del serotipo DENV-3.

Como resultado del análisis de los cebadores empleados para la detección del serotipo DENV-3, se pudo determinar que la unión de ambos cebadores resulta específica para el serotipo en cuestión. El tamaño de fragmento que se espera por la amplificación con estos cebadores es de 290 pb.

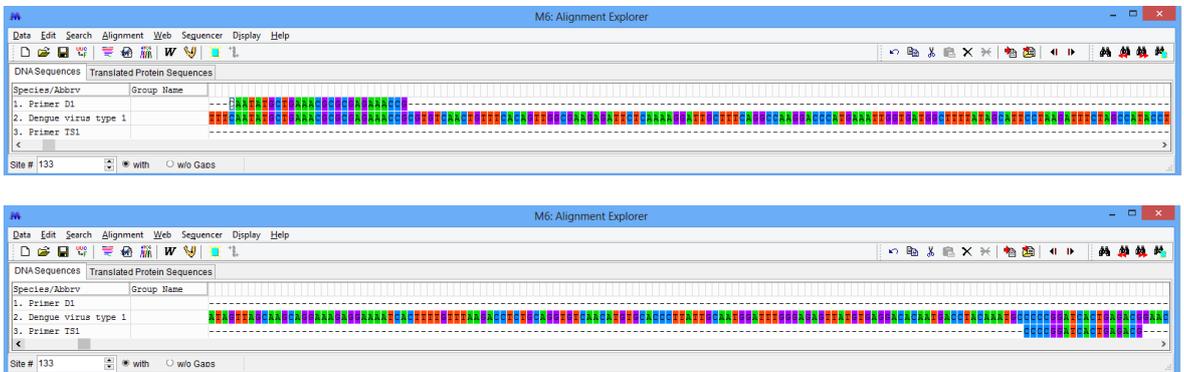




Pantalla del NCBI con la información de los cebadores empleados para la amplificación por RT-PCR del serotipo DENV-4.



Pantalla del software “MEGA 6.0” con el producto del alineamiento de los cebadores D1 y TS3 con el genoma del serotipo DENV-4.



Pantalla del software “MEGA 6.0” con el producto del alineamiento de los cebadores D1 y TS3 con el genoma del serotipo DENV-1.

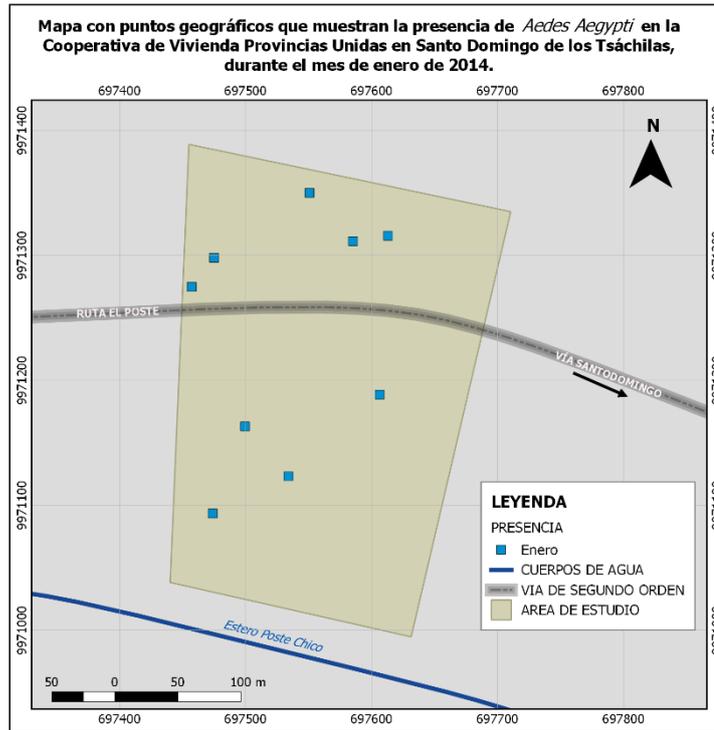
Anexo 4: Tabla de resultados de serotipificación del virus del dengue por individuo analizado.

Código	Fecha de colecta	Resultado	Serotipo
E16-7	07-ene-14	Negativo	
E16-8	07-ene-14	Negativo	
E18-1	07-ene-14	Positivo	DENV-2
E18-2	07-ene-14	Negativo	
E18-3	07-ene-14	Negativo	
E18-4	07-ene-14	Negativo	
E20-1	08-ene-14	Indeterminado	
E26-1	08-ene-14	Positivo	DENV-2
E37-1	08-ene-14	Positivo	DENV-2
E37-2	08-ene-14	Negativo	
E37-3	08-ene-14	Negativo	
F1-1	03-feb-14	Negativo	
F1-2	03-feb-14	Positivo	DENV-2
F2-1	03-feb-14	Negativo	
F4-1	03-feb-14	Negativo	
F6-1	03-feb-14	Negativo	
F9-1	03-feb-14	Negativo	
F11-1	03-feb-14	Negativo	
F13-1	03-feb-14	Negativo	
F15-1	03-feb-14	Negativo	
F16-1	04-feb-14	Negativo	
F16-2	04-feb-14	Negativo	
F20-1	04-feb-14	Negativo	
F21-1	04-feb-14	Negativo	
F22-1	04-feb-14	Negativo	
F23-1	04-feb-14	Negativo	
F30-1	04-feb-14	Negativo	
F30-2	04-feb-14	Positivo	DENV-2
F30-3	04-feb-14	Negativo	
F30-4	04-feb-14	Positivo	DENV-2
F33-1	05-feb-14	Positivo	DENV-2
F34-1	05-feb-14	Negativo	
F37-1	05-feb-14	Positivo	DENV-2
F38-1	05-feb-14	Positivo	DENV-2

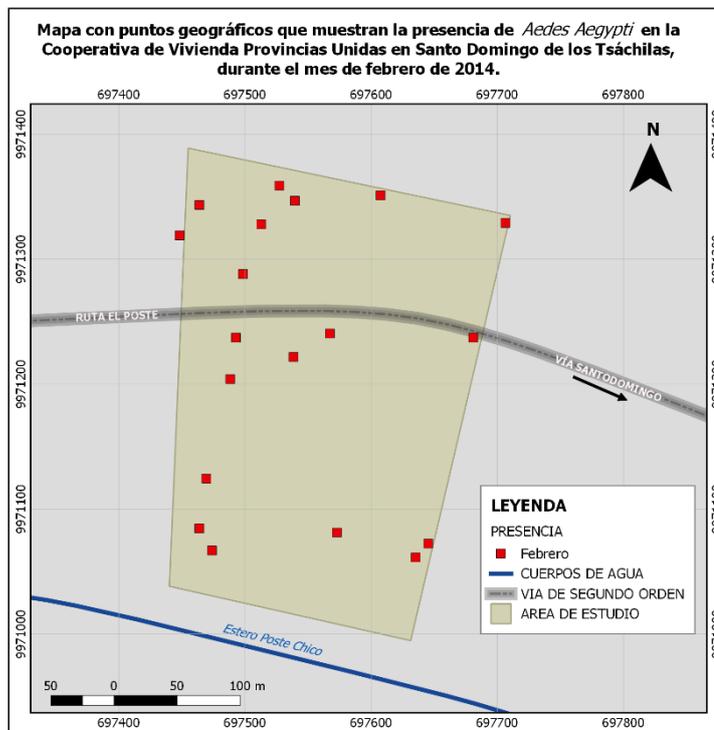
F42-1	05-feb-14	Positivo	DENV-2
M3-1	06-mar-14	Indeterminado	
M5-1	06-mar-14	Positivo	DENV-3
M11-1	06-mar-14	Negativo	
M31-1	06-mar-14	Negativo	
M34-1	07-mar-14	Positivo	DENV-1
A5-1	01-abr-14	Negativo	
A7-1	01-abr-14	Negativo	
A11-1	01-abr-14	Negativo	
A29-1	02-abr-14	Negativo	
A32-1	02-abr-14	Negativo	
A32-2	02-abr-14	Negativo	
A32-3	02-abr-14	Negativo	
A36-1	02-abr-14	Negativo	
A36-2	02-abr-14	Negativo	

Tabla de resultados con la codificación, resultado y serotipo encontrado en las muestras procesadas.

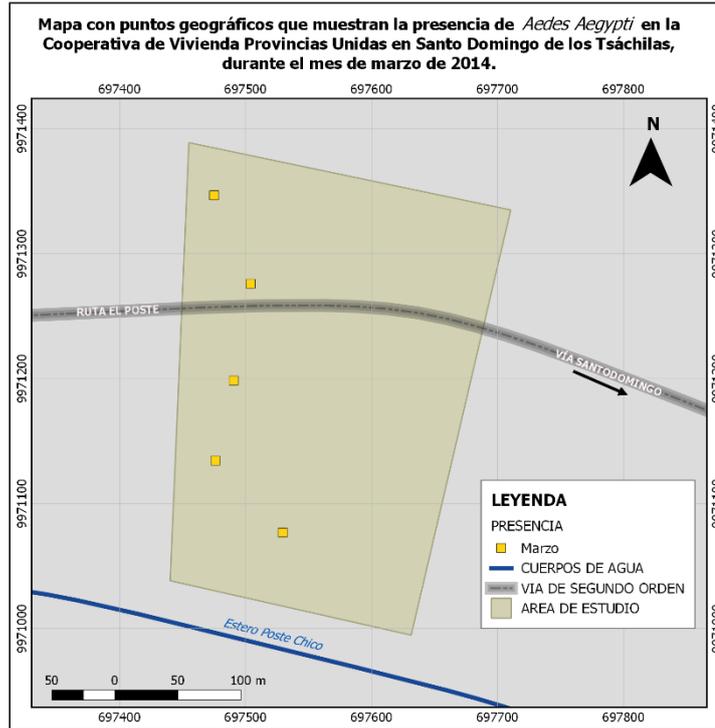
Anexo 5: Mapas del área de estudio con los puntos geográficos de presencia de *Aedes aegypti*.



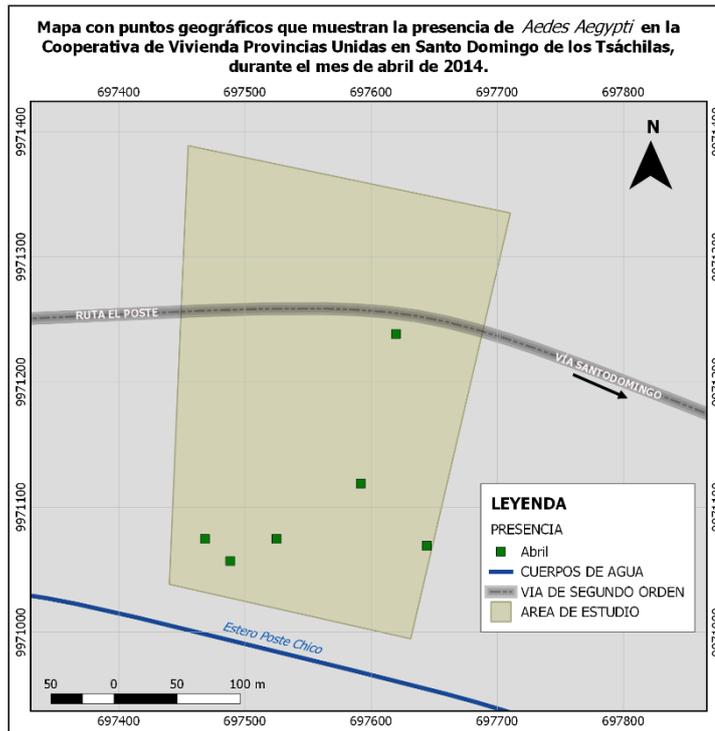
Notas: SATVEC-Dengue, 2014



Notas: SATVEC-Dengue, 2014

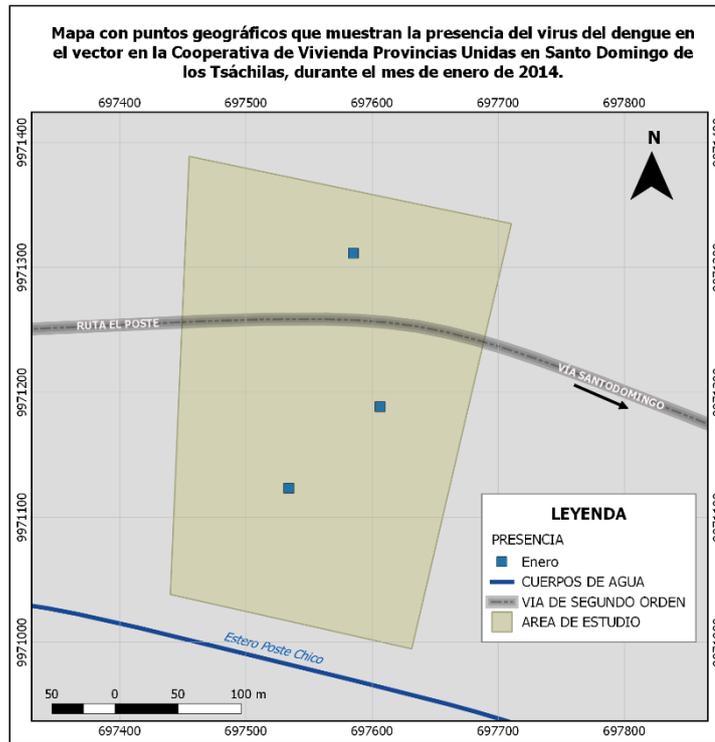


Notas: SATVEC-Dengue, 2014

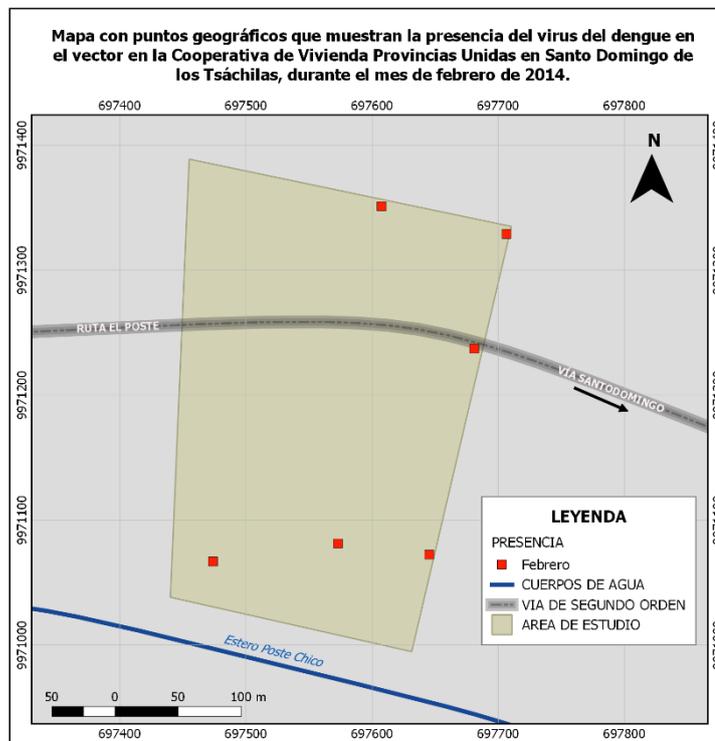


Notas: SATVEC-Dengue, 2014

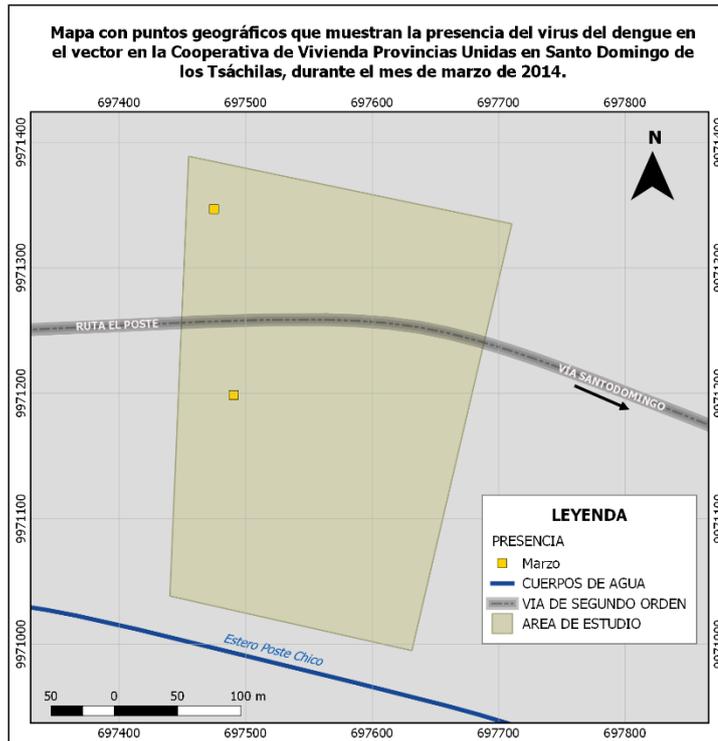
Anexo 6: Mapas del área de estudio con puntos georeferenciales de presencia del virus del dengue.



Notas: SATVEC-Dengue, 2014



Notas: SATVEC-Dengue, 2014



Notas: SATVEC-Dengue, 2014

Anexo 7: Extracción de RNA total a partir de individuos de *Aedes aegypti*

Previo al desarrollo del protocolo de extracción de RNA total se reconstituyeron los buffer de lavado: Wash Solution 1 Concentrate y Wash Solution 2/3 Concentrate. Para el Wash Solution 1 se agregó 10,5 mL de etanol 100% grado ACS; para el Wash Solution 2/3 se debió agregar 22,4 mL de etanol 100% grado ACS. Ambos envases debieron ser marcados para saber que el etanol fue añadido.

Para cada muestra a ser procesada se debió preparar una columna de filtro con su respectivo tubo de colecta que viene incluido en el kit; el Wash Solution 2/3 se acondicionó a temperatura ambiente y se realizó una incubación de una alícuota de 40µL por muestra de Elution Solution a 75°C en un termociclador de marca Techne.

Los individuos conservados en RNAlater fueron descongelados a temperatura ambiente, se retiraron del reactivo y ubicados en papel absorbente para eliminar el exceso de reactivo.

Cuando el individuo se encontraba seco se lo colocó en un tubo eppendorf de 1,5 mL libre de RNAsas, se agregaron 125µL de Lysis Solution y con la ayuda de un pistilo de plástico estéril adaptado a un homogeneizador de la marca PowerGen, se procedió a triturar completamente al individuo. Se agregaron 125µL de Etanol 100% grado ACS y se lo mezcló con la ayuda de un agitador vórtex.

Se tomaron 150µL de la muestra y se lo colocaron en un conjunto de columna con filtro y tubo de colecta; se centrifugó por 15 segundos a máxima velocidad hasta que todo el líquido haya atravesado el filtro. Debido a que el volumen de la mezcla fue mayor a 150µL, se tuvo que repetir este proceso con otros 150µL hasta completar el volumen total. Debido a que la presencia de estructuras del mosquito en el filtro provocó obstrucción al momento de la centrifugación, fue necesario en algunos casos agregar 50µL de Etanol 100% grado ACS en la columna de filtro.

Posteriormente se agregó a la columna de filtro 180µL de Wash Solution 1, se cerró la tapa y se centrifugó a una velocidad de 13000 rpm durante 15 segundos o más hasta que todo el líquido haya pasado por el filtro. A continuación se agregaron 180µL de Wash Solution 2/3, se cerró la tapa y se centrifugó por 15 segundos a 13000 rpm; este proceso se repitió una vez más con una segunda alícuota de 180µL de Wash Solution 2/3.

Se retiró la columna de filtro del tubo de colecta y se descartó el líquido presente en este último y se reubicó el tubo de colecta; se procedió a centrifugar por un minuto y medio a máxima velocidad para remover fluidos residuales y secar el filtro.

A continuación se transfirió la columna de filtro a un nuevo tubo de colecta; se abrió la tapa de la columna de filtro y se agregaron 10 μ L de Elution Solution precalentado a 75°C en el centro del filtro, se cerró la tapa y se dejó reposar durante 1 minuto a temperatura ambiente. A continuación se procedió a centrifugar a una velocidad de 13000 rpm durante 40 segundos para eluir el RNA del filtro. Este proceso se repitió con una segunda y tercera alícuota de 10 μ L y centrifugación.

El RNA extraído fue transferido a tubos eppendorf de 1,5 mL libres de RNAsas y DNAsas, y almacenado a -20°C hasta la preparación de las reacciones de PCR. Para almacenamiento por más tiempo se congelaron las muestras a -80°C.

Anexo 8: Resultados del análisis de ANOVA en el software Minitab

General Linear Model: Presencia de Virus versus Área de Colecta. Mes de Captura

Method

Factor coding (-1. 0. +1)

Factor Information

Factor	Type	Levels	Values
Área de Colecta	Fixed	4	a. b. c. d
Mes de Captura	Fixed	4	Abril. Enero. Febrero. Marzo

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Área de Colecta	3	1,089	0,3630	2,10	0,114
Mes de Captura	3	1,249	0,4163	2,41	0,080
Error	42	7,251	0,1726		
Lack-of-Fit	5	1,584	0,3169	2,07	0,091
Pure Error	37	5,667	0,1532		
Total	48	9,061			

Model Summary

S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
0,415507	19,98%	8,54%	0,00%

Anexo 9: Tabla de individuos analizados por área de colecta

Individuo Vector	Mes de Captura	Área de Colecta	Presencia de Virus
E16-7	Enero	1	0
E16-8	Enero	1	0
E18-1	Enero	2	1
E18-2	Enero	2	0
E18-3	Enero	2	0
E18-4	Enero	2	0
E20-1	Enero	2	0
E26-1	Enero	2	1
E37-1	Enero	3	1
E37-2	Enero	3	0
E37-3	Enero	3	0
F1-1	Febrero	3	0
F1-2	Febrero	3	1
F2-1	Febrero	3	0
F4-1	Febrero	3	0
F6-1	Febrero	1	0
F9-1	Febrero	1	0
F11-1	Febrero	1	0
F13-1	Febrero	1	0
F15-1	Febrero	1	0
F16-1	Febrero	1	0
F16-2	Febrero	1	0
F20-1	Febrero	1	0
F21-1	Febrero	1	0
F22-1	Febrero	2	0
F23-1	Febrero	1	0
F30-1	Febrero	4	0
F30-2	Febrero	4	1
F30-3	Febrero	4	0
F30-4	Febrero	4	1
F33-1	Febrero	4	1
F34-1	Febrero	4	0
F37-1	Febrero	2	1
F38-1	Febrero	2	1
F42-1	Febrero	2	1
M3-1	Marzo	4	0
M5-1	Marzo	1	1
M11-1	Marzo	4	0
M31-1	Marzo	1	0
M34-1	Marzo	1	1
A5-1	Abril	3	0
A7-1	Abril	3	0
A11-1	Abril	3	0
A29-1	Abril	4	0
A32-1	Abril	4	0
A32-2	Abril	4	0
A32-3	Abril	4	0
A36-1	Abril	2	0

