



Anales de la Facultad de Medicina

ISSN: 1025-5583

anales@unmsm.edu.pe

Universidad Nacional Mayor de San
Marcos
Perú

Real-Cotto, Jhony Joe; Regato Arrata, Mary Ernestina; Burgos Yépez, Virginia Elisa;
Jurado Cobeña, Eduardo Tarquino

Evolución del virus dengue en el Ecuador. Período 2000 a 2015
Anales de la Facultad de Medicina, vol. 78, núm. 1, 2017, pp. 29-35
Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Lima, Perú

Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=37950991005>

- Cómo citar el artículo
- Número completo
- Más información del artículo
- Página de la revista en redalyc.org

redalyc.org

Sistema de Información Científica
Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal
Proyecto académico sin fines de lucro, desarrollado bajo la iniciativa de acceso abierto

Evolución del virus dengue en el Ecuador. Período 2000 a 2015

Evolution of dengue virus in Ecuador 2000-2015

Jhony Joe Real-Cotto^{1,a}, Mary Ernestina Regato Arrata^{1,b}, Virginia Elisa Burgos Yépez^{2,c},
Eduardo Tarquino Jurado Cobeña^{2,d}

¹ Docente, Universidad de Guayaquil, Ecuador.

² Departamento de Virología, Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública, Ecuador.

^a Magíster en Epidemiología, Doctor en Medicina y Cirugía; ^b Magíster en Biotecnología, Doctor en Medicina y Cirugía; ^c Tecnólogo, Médico de Laboratorio; ^d Magíster en Biotecnología, Médico Veterinario.

Correspondencia

Jhony Real Cotto

jreal_cotto@hotmail.com;
realcottoj@gmail.com

Ciudadela Polaris, Mz. 797, villa
12. Parroquia Tarqui, Guayaquil –
Ecuador

Recibido, 9 diciembre 2016

Evaluated, 18 enero 2017

Aprobado, 20 enero 2017

Ningún conflicto de intereses.

El contenido del manuscrito no ha
sido publicado previamente.

Consentimiento informado:

Aprobado por el Instituto Nacional
de Investigación en Salud Pública
"Leopoldo Izquieta Pérez"

Autofinanciado por los autores.

Citar como: Real Cotto JJ, Regato
Arrata ME, Burgos Yépez VE, Jurado
Cobeña ET. Evolución del virus
dengue en el Ecuador. Período 2000
a 2015. *An Fac med.* 2017;78(1):29-
35. DOI: <http://dx.doi.org/10.15381/anales.v78i1.13018>

An Fac med. 2017;76(1):29-35 / <http://dx.doi.org/10.15381/anales.v78i1.13018>

Resumen

Introducción. Actualmente la infección por virus dengue constituye una de las arbovirosis más importantes y de amplia distribución en las regiones tropicales y subtropicales del planeta. **Objetivo.** Determinar la evolución del virus dengue circulante en el Ecuador durante el periodo 2000 a 2015. **Diseño.** Estudio no experimental, transversal, de tipo descriptivo y correlacional; **Lugar.** Unidades de salud del Ecuador. **Participantes.** Muestras tomadas a sospechosos de dengue con menos de 5 días de iniciada su enfermedad. **Resultados.** En el año 2000 se tuvo la presencia de los 4 serotipos, con predominio del DEN3 durante 2001 al 2006, coincidentes con los incrementos de casos del 2000, 2001 y 2005; en el año 2004 reapareció el virus DEN1 y los años siguientes su presencia predominó entre 2007 y 2012, coincidiendo con el incremento de casos en el 2010. Del año 2011 al 2015 se presentaron 3 virus circulantes a la vez (DEN1, DEN2 y DEN4), en 2014 y 2015 hubo la presencia del virus DEN3, con predominio del virus DEN2 en 2013 y 2014 y virus DEN1 en 2015; y ha sido la provincia del Guayas la de mayor relación con los virus. **Conclusiones.** La presencia de varios serotipos de virus dengue circulando a la vez y su permanencia se debería a otros factores que están influenciando en el comportamiento del virus, con una variabilidad de los cuatro serotipos. Se debe fortalecer la vigilancia molecular de la circulación de serotipos, genotipos y linajes del virus dengue.

Palabras clave. Dengue; Virus; Serotipos; Evolución.

Abstract

Introduction: Nowadays, the dengue virus infection is one of the most important arboviroses in the world's tropical and subtropical regions. **Objective:** To determine the evolution of the dengue virus circulating in Ecuador during the period 2000-2015. **Design:** Non-experimental, transversal, descriptive and correlational study. **Setting:** Health units of Ecuador. **Participants:** The samples were taken from dengue suspects with less than 5 days from the beginning of the disease. **Results:** In 2000, the four serotypes were present, with prevalence of DEN3 during 2001-2006 coinciding with the increase of cases in 2000, 2001 and 2005; in 2004, the DEN1 virus reappeared and, during the following years, its presence predominated between 2007 and 2012, coinciding with the increase of cases in 2010. From 2011 to 2015 three circulating viruses were present at the same time (DEN1, DEN2 and DEN4); in 2014 and 2015, the DEN3 virus predominated; the predominance of the DEN2 virus was in 2013 and 2014, and of the DEN1 virus in 2015. The province of Guayas had the greatest relation with the virus. **Conclusions:** The presence and permanence of several serotypes of dengue virus circulating at the same time is due to other factors influencing the virus behavior and variability of the four serotypes. The molecular surveillance of the circulating serotypes, genotypes and dengue virus lineages should be strengthened.

Keywords: Dengue; Virus; Serotypes; Evolution.

INTRODUCCIÓN

El dengue es una enfermedad viral aguda transmitida a través de la picadura del mosquito (artrópodo) *Aedes aegypti* infectado con cualquiera de los serotipos de virus dengue. Son virus envueltos, de 40 a 50 nm de diámetro, con cápside icosaédrica y genoma de ácido ribonucleico (ARN) monocatenario, no segmentado, de polaridad positiva perteneciente al género *flavivirus* de la familia *Flaviviridae* ⁽¹⁾. En base a estudios serológicos, se ha reconocido cuatro tipos o serotipos antigénicos, DEN1, DEN2, DEN3 y DEN4, teniendo cada uno de ellos gran heterogeneidad de cepas determinada en su secuencia de ARN, lo cual tiene utilidad epidemiológica. El análisis filogenético de las distintas cepas del virus dengue indica que la diseminación global ha dado lugar a distintos genotipos dentro de cada serotipo ⁽²⁾.

Todos los serotipos de dengue tienen diferencias genotípicas y sus interacciones con el vector y huésped indudablemente influyen en las manifestaciones de la enfermedad y en su transmisión epidémica, en la que también inciden otros factores relacionados al medio, al vector y a la población susceptible. Los cuatro serotipos causan aproximadamente 50 a 100 millones de infecciones humanas cada año en el mundo entero ⁽³⁾, representado por cuadro clínico de dengue sin signos de alarma hasta dengue grave. Se estima que en el 2014 (semana epidemiológica 16) se presentaron 385 389 casos de dengue, 3 075 casos graves y 130 muertes (CFR 0,03%) ^(4,5).

Actualmente, la infección por virus dengue constituye una de las arbovirosis más importantes y de más amplia distribución en las regiones tropicales y subtropicales del planeta, cuya transmisión incluye un ciclo selvático enzoótico entre primates inferiores y mosquitos del género *Aedes* que ha evolucionado desde su ciclo selvático ancestral hasta adaptarse a un ciclo urbano endémico-epidémico entre el mosquito *Aedes aegypti* y los humanos como huéspedes ^(6,7). El principal proceso fisiopatológico que distingue el dengue grave del cuadro moderado de dengue clásico, es la aparición brusca de extravasación vascular, hipotensión y

choque, los que acompañados de trombocitopenia y diátesis hemorrágica pueden llevar a casos fatales. Esto se presenta en pacientes que se han reinfectado con un serotipo diferente; por lo que todos los cuatro serotipos del virus dengue pueden dar lugar a un proceso de disfunción del sistema inmune, todavía no bien entendido, que conduce a un aumento del número de células infectadas mediado por un incremento de anticuerpos homotípicos y heterotípicos que dan lugar a la activación del complemento ^(8,9), a lo que se suma una disminución de la capacidad protectora de los linfocitos T CD8 y la producción de citoquinas ^(10,11).

Datos epidemiológicos y de laboratorio sugieren que la infección inicial con cualquier serotipo, a pesar de que confiere una inmunidad homóloga duradera para el resto de la vida, sensibiliza el individuo al dengue grave durante la infección secundaria con los otros serotipos restantes, a través de un incremento de anticuerpos dependientes que en conjunto con otros factores del huésped y del virus contribuyen a su patogénesis ⁽¹²⁻¹⁴⁾.

El dengue grave fue reconocido principalmente como una enfermedad de niños en el Sudeste Asiático. Los estudios han demostrado que entre 2% y 4% de los niños que tienen una infección secundaria de dengue tienen enfermedades graves ⁽¹⁵⁾; sin embargo, su aparición en las Américas como enfermedad severa ha sido señalada tanto en niños como en adultos, siendo la infección secundaria el principal factor de riesgo.

En nuestro país, Ecuador, la figura epidemiológica se hizo evidente el dengue luego de la introducción del serotipo DEN1 en 1988, el ingreso del DEN2 genotipo americano en Guayaquil en 1990, posteriormente en 1993 se produjo la introducción del DEN4, y desde entonces hasta 1999 estuvieron circulando y propagándose en el país los tres serotipos, hasta que en el año 2000 se dio la introducción simultánea del DEN3 genotipo III y el genotipo asiático del DEN2 ⁽¹⁶⁾. Se observó desde entonces la aparición cada vez más frecuente de fenómenos graves, al comienzo en adultos y en años posteriores, en niños ⁽¹⁷⁾. La reactivación

masiva de circulación viral y transmisión de la enfermedad actualmente en 80% de las provincias del país, especialmente en aquellas de clima cálido - húmedo y tropical, más la incursión del vector sumado a la presencia de las variantes virales, incrementa el riesgo de epidemias, más aún si se tiene historia de circulación de los cuatro serotipos del virus dengue en el Ecuador. De tal manera que el objetivo de este artículo es determinar la evolución del virus dengue circulante en el Ecuador durante el periodo 2000 a 2015.

MÉTODOS

El diseño de este estudio fue transversal, de tipo descriptivo y correlacional, donde se evidencia la situación desde el punto de vista virológico del dengue en el Ecuador. Así también la circulación de sus diferentes serotipos en los años 2000 al 2015, basado en la vigilancia virológica y serológica en las diferentes provincias del país. Se utilizó como unidad de análisis las muestras de los pacientes con sospecha de dengue tomadas a usuarios en las unidades de salud con menos de 5 días de iniciada su enfermedad.

Para la determinación viral se utilizaron las técnicas de aislamiento viral e identificación por inmunofluorescencia. Para la determinación del serotipo viral se utilizó aislamiento y/o RT PCR mediante la línea celular C6/36 de *Aedes albopictus*, medio de crecimiento *Minimum Essential Medium* (MEM) con 10% de suero fetal bovino (SFB), 1% de aminoácidos esenciales, 1% de L-glutamina y 10 mg/mL de penicilina-estreptomicina. Una vez obtenida la monocapa en botellas plásticas de 75 mL, se prepararon tuberas de 60 tubos y en cada uno de ellos se inocularon las muestras diluidas en medio de MEM (1:5). Por espacio de una hora se mantuvieron en incubación tres tubos por muestra; en cada uno se inoculó 50 µL de la muestra. Luego se añadió medio de mantenimiento MEM suplementado al 2% con SFB. Los cultivos inoculados fueron observados por 8 a 10 días ^(18,19).

Posteriormente, se recogió el sobrenadante y las células del cultivo fueron colocadas en placas portaobjeto que se

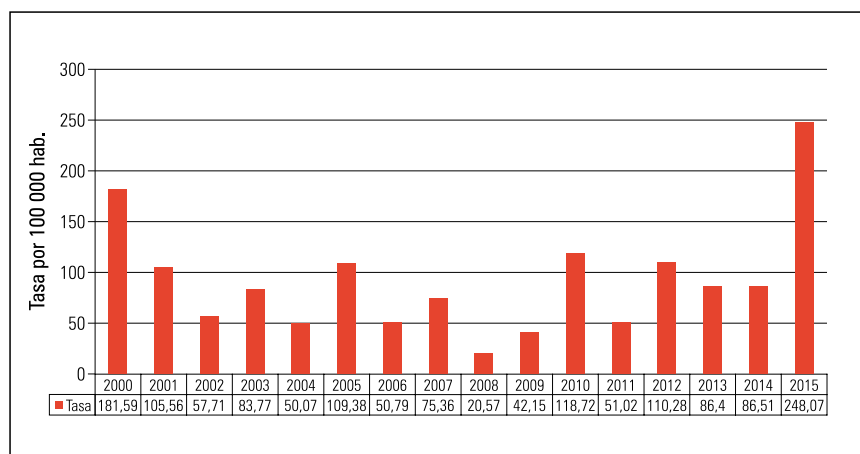


Figura 1. Casos de dengue sin signos de alarma en el Ecuador, según años. Período 2000-2015.

fijaron en acetona a -20°C . Para la prueba de inmunofluorescencia (IFI) se utilizó líquido ascítico policlonal (1:50), proporcionado por la Unidad de Investigación Médica Naval-6 (NAMRU-6) de la Marina de los Estados Unidos, Lima, Perú. Las muestras positivas fueron confirmadas y tipificadas con IFI, utilizando anticuerpos monoclonales específicos de cada serotipo ⁽²⁰⁾.

Además, la tipificación por biología molecular para la identificación del serotipo circulante utilizó la técnica de reacción en cadena de la polimerasa con transcripción reversa (RT-PCR), en un solo paso, técnica de punto final hasta el año 2013. Después de este año se ha utilizado técnicas de PCR en tiempo real. El ARN viral se aisló a partir de sueros sanguíneos de pacientes sospechosos de dengue clásico o dengue grave por el método de isotiocianato de guanidino/fenol, Trizol o por medio de métodos comerciales de extracción por columnas (QIAGEN). El ácido nucleico viral fue resuspendido en 20 μl a 60 μl de agua libre de ARNasa. Se utilizó 1 cebador 5' complementario a una secuencia conservada en la región de capsido y 4 cebadores 3', cada uno de los cuales es complementario a secuencias únicas de cada serotipo. Se siguió un procedimiento abreviado de un solo paso para la transcripción reversa y amplificación del ARN viral, tal como se ha descrito anteriormente ⁽²⁰⁻²²⁾. La técnica de RT-PCR

en tiempo real se realizó con el kit de "Simplex Focus diagnóstico ensayo de reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real", para la detección *in vitro* y tipificación de los serotipos 1, 2, 3, 4 del virus dengue en el ser humano ⁽²³⁾.

RESULTADOS

En la Figura 1 se toma como referencia los casos de dengue sin signos de alarma y su comportamiento durante el periodo 2000 al 2015, donde se pudo observar el incremento de casos en los años 2000, 2001, 2005, 2010, 2012 y 2015 en que se presentaron 100 o más casos por cada 100 000 habitantes, el mismo que se manifiesta con presencia permanente y variaciones de la enfermedad durante esta serie de años en el Ecuador.

En la figura 2 se observa los diferentes serotipos de virus dengue detectados en el país, iniciando por primera vez en el año 2000 con la presencia de los 4 serotipos, para luego observar el predominio del DEN3 durante los años 2001 al 2006 frente a los otros virus, que coincide con los incrementos de casos de dengue del 2000, 2001 y 2005. Es de anotar que para fines del 2004 reaparece el virus DEN1, el cual incrementó su presencia, predominando entre los años 2007 al 2012. Coincidió en su máxima frecuencia con el incremento de casos en el 2010. A partir

del año 2011 hasta el 2015 se exhibieron 3 virus circulantes a la vez (DEN1, DEN2 y DEN4). En el 2014 y 2015 se observó brevemente la presencia del virus DEN3, con predominio del virus DEN2 en 2013 y 2014 y del virus DEN1 en 2015, en coincidencia con el aumento de casos del 2012 y 2015, por el predominio de este último virus.

En la tabla 1 se observa la relación de la tipificación del virus dengue por años de acuerdo a zonas de planificación territorial y provincias en el Ecuador. Se ha obtenido en los diferentes años la presencia de los 4 serotipos de virus y en algunos años la tipificación genotípica, como el serotipo DEN1 con genotipificación americana y africana; en el DEN2, los genotipos americano y asiático; en DEN3, genotipo III Sri Lanka y DEN4 genotipo II; y en los 5 últimos años se observa mayor presencia de diferentes serotipos, coincidiendo con el cambio de una técnica diagnóstica más sensible.

En la figura 3 se visualiza el mapa de planificación territorial y zonificación en el Ecuador, el mismo que consta de 9 zonas, y estas están conformadas por varias provincias con excepción de la zona 8, que corresponde a los cantones de Guayaquil, Durán y Samborombon, y de la zona 9 al distrito metropolitano de Quito. Los mapas de zonas de planificación territorial y provincias del Ecuador se relacionan con el tipo de virus dengue circulante durante el periodo 2000-2009 como antecedente y visión de la panorámica de estos 10 años y posteriormente el comportamiento del 2010 al 2015, que son los últimos 6 años. En el 2010 se visualizó la presencia del virus DEN1 en la mayoría de las provincias; a partir del 2011 se observa la presencia de 2 a 3 serotipos circulantes en las zonas de la costa ecuatoriana, como son Esmeraldas (Zona 1), Manabí (Zona 4), Los Ríos (Zona 5) y Guayaquil (Zona 8). Para el año 2012 al 2015, esta presencia de varios serotipos se incrementa a más zonas del país y provincias, como son Esmeraldas y Sucumbios (Zona 1); Napo (Zona 2); Manabí (Zona 4); Los Ríos Santa Elena, Bolívar y Galápagos (Zona 5); Cañar, Azuay y Morona Santiago (Zona 6); El Oro (Zona 7); y Guayaquil (Zona 8). Además, de la detección del DEN3 en una muestra del Azuay.

Tabla 1. Tipificación del virus dengue en el Ecuador según zonas de planificación territorial, provincias y años.

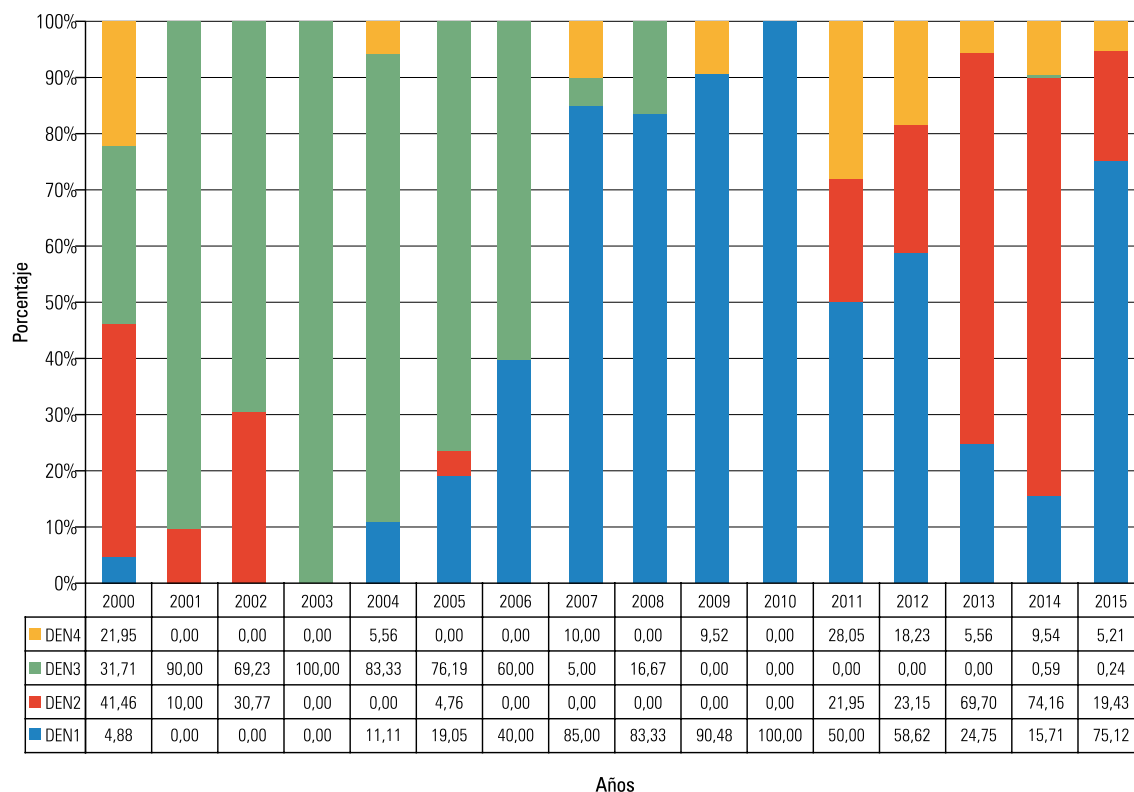
Zona de planificación	Provincias	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015
Zona 1	Esmeraldas								DEN1			DEN1	DEN1	DEN1		DEN1	
													DEN2 AM DEN2 AS		DEN2	DEN2	
	Sucumbios	DEN2 AS	DEN3			DEN4								DEN1 DEN2	DEN1 DEN2	DEN4	DEN4
Zona 2 - 9	Imbabura															DEN1 DEN4	
	Pichincha																DEN1
	Napo						DEN1							DEN1			
	Orellana			DEN2			DEN4			DEN3		DEN1 AM DEN1 AF		DEN4			DEN1 DEN2
Zona 3	Cotopaxi											DEN1		DEN1	DEN1 DEN2	DEN2	DEN1
	Chimborazo											DEN1	DEN1				DEN1
	Tungurahua													DEN1			
	Pastaza												DEN1 AM DEN1 AF				DEN2
Zona 4	Manabí						DEN1					DEN1	DEN1	DEN1	DEN1	DEN1	DEN1
													DEN2	DEN2	DEN2	DEN2	DEN2
							DEN3										
Zona 5 - 8	Sto. Domingo											DEN1		DEN4	DEN4	DEN4	DEN4
												DEN1		DEN2	DEN2	DEN2	
		DEN1				DEN1		DEN1	DEN1	DEN1		DEN1 AM DEN1 AF	DEN1	DEN1	DEN1	DEN1	DEN1
	Guayas	DEN2 AM		DEN2									DEN2	DEN2	DEN2	DEN2	DEN2
		DEN2 AS														DEN3	
		DEN3 III	DEN3	DEN3	DEN3	DEN3	DEN3	DEN3	DEN3								
		DEN4											DEN4 II	DEN4	DEN4	DEN4	DEN4

Zona de planificación	Provincias	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015
Zona 5 - 8	Los Ríos				DEN3				DEN1			DEN1 AM DEN1 AF		DEN1	DEN1	DEN1	DEN1
							DEN3				DEN4			DEN2	DEN2	DEN2	DEN2
	Bolívar											DEN1		DEN1	DEN1		DEN1
	Sta. Elena				DEN3									DEN2 DEN4	DEN2	DEN2	DEN4
Zona 6	Galápagos			DEN2								DEN1		DEN1 DEN4		DEN2	DEN1
	Azuay											DEN1			DEN1	DEN2	DEN1 DEN2 DEN3
	Cañar											DEN1			DEN1 DEN2 DEN4	DEN1 DEN2 DEN4	DEN1 DEN2 DEN4
	Morona											DEN1	DEN1			DEN1 DEN2 DEN4	
Zona 7	El Oro								DEN1			DEN1	DEN1	DEN1		DEN1	DEN1
									DEN2						DEN2	DEN2	DEN2
					DEN3												
	Loja					DEN3						DEN1 AM DEN1 AF				DEN2	
	Zamora											DEN1	DEN1	DEN1	DEN4		DEN1

DEN1: Dengue tipo 1; DEN2: Dengue tipo 2; DEN3: Dengue tipo 3; DEN4: Dengue tipo 4

DEN AM: Dengue genotipo americano; DEN AF: Dengue genotipo África; DEN AS: Dengue genotipo asiático; DEN II - III: Dengue genotipo II o III

Fuente: Departamento de Virología – Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública "Leopoldo Izquierda Pérez".



Fuente: Departamento de Virología - Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública "Leopoldo Izquieta Pérez".

Figura 2. Virus dengue circulantes en el Ecuador, según serotipo. Período 2000-2015.

Es de considerar que en este período revisado se ha tenido la referencia de uno o varios tipos de virus dengue, de las cuales se ha determinado el serotipo y genotipo con su respectivo linaje en la mayoría de las provincias del país, con colaboración del Instituto de Salud Carlos III de España y del Instituto Pasteur en Uruguay Montevideo ⁽²⁴⁾.

Es importante destacar que la problemática de dengue no solo debe estudiársela por el virus causante de la enfermedad, sino que existen otros elementos como el vector transmisor, las personas susceptibles, factores ambientales condicionantes, entre otros; que limita a este estudio a valorarlo de manera integral.

En conclusión, al revisar la situación epidemiológica de los años estudiados, se demuestra que existe la circulación de los 4 serotipos de virus dengue en el Ecuador, observándose la presencia de

algún serotipo en la mayoría de las provincias; y ante la circulación de serotipos de virus diferentes o la reaparición de virus que habían circulado anteriormente, como los virus DEN1, DEN2 y DEN4 a la vez, han puesto en riesgo a la población de sufrir la enfermedad en sus diversas formas, en los últimos años.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Rothman AL. Dengue: defining protective versus pathologic immunity. *J Clin Invest*. 1 de abril de 2004;113(7):946-51.
2. Crill WD, Roehrig JT. Monoclonal antibodies that bind to domain III of dengue virus E glycoprotein are the most efficient blockers of virus adsorption to vero cells. *J Virol*. 15 de agosto de 2001;75(16):7769-73.
3. Bhatt S, Gething PW, Brady OJ, Messina JP, Farlow AW, Moyes CL, et al. The global distribution and burden of dengue. *Nature*. 2013;496(7446):504-7. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1038/nature12060>
4. Organización Panamericana de la Salud. Prevención y control del dengue en las Américas: Situación del dengue en las Américas y su abordaje: Perspectiva de la OPS. Washington D.C. 2014.
5. Gubler DJ. Epidemic dengue/dengue hemorrhagic fever as a public health, social and economic problem in the 21st century. *Trends Microbiol [Internet]*. 2016 Nov 3;10(2):100-3. Disponible en: [http://dx.doi.org/10.1016/S0966-842X\(01\)02288-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0966-842X(01)02288-0)
6. Gubler DJ, Ooi EE, Vasudevan S, Farrar J. Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever, 2nd Edition. CABI; 2014: 626 p.
7. Go YY, Balasuriya UBR, Lee C-K. Zoonotic encephalitis caused by arboviruses: transmission and epidemiology of alphaviruses and flaviviruses. *Clin Exp Vaccine Res [Internet]*. 2014;3(1):58-77. Disponible en: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3890452&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
8. Organización Mundial de la Salud. Dengue Guías para el Diagnóstico, Tratamiento, Prevención y Control. OMS y Programa Espec Para Investig y Capacit Enfermedades Trop. 2009;113-5.
9. Martínez Torres E. Dengue. *Estud Av*. diciembre de 2008;22(64):33-52. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-40142008000300004>
10. Münz C. Dengue virus: Protection by T cells, disease exacerbation by antibodies? *EBioMedicine*.

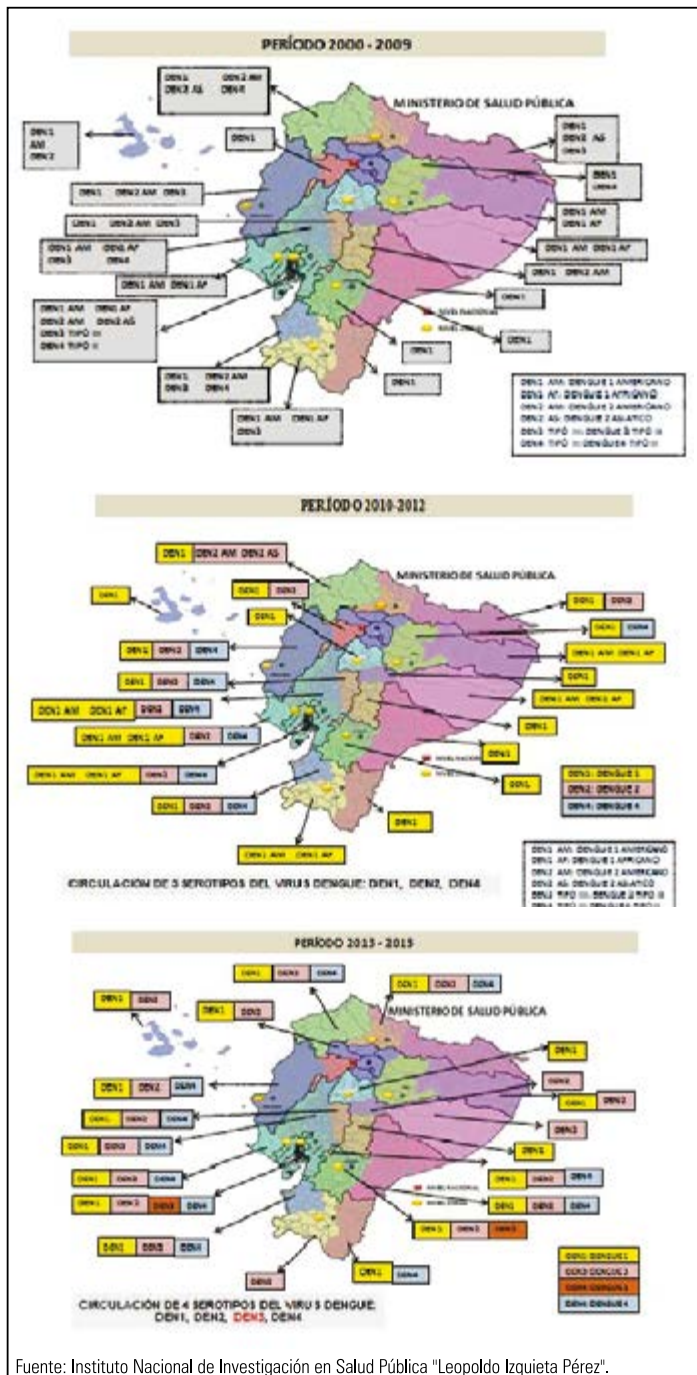


Figura 3. Mapas de virus dengue circulantes y tipificación, según zonas de planificación territorial y provincias del Ecuador. Período 2000-2015.

- 2016;7-8. doi: 10.1016/j.ebiom.2016.10.031.
11. Avirutnan P, Punyadee N, Noisakran S, Komoltri C, Thiemmecca S, Auethavornanan K, et al. Vascular leakage in severe dengue virus infections: A potential role for the nonstructural viral protein NS1 and complement. *J Infect Dis* [Internet]. 2006;193(8):1078-88.
 12. Green S, Vaughn DW, Kalayanarooj S, Nimmannitya S, Suntayakorn S, Nisalak a, et al. Early immune activation in acute dengue illness is related to development of plasma leakage and disease severity. *J Infect Dis*. 1999;179(II):755-62.
 13. Twiddy SS, Farrar JJ, Vinh Chau N, Wills B, Gould EA, Gritsun T, et al. Phylogenetic relationships and differential selection pressures among genotypes of dengue-2 virus. *Virology*. 2002;298(1):63-72. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1006/viro.2002.1447>
 14. Guzman MG, Harris E. Dengue. *The Lancet*. 6 de febrero de 2015;385(9966):453-65. Disponible en: [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(14\)60572-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(14)60572-9)
 15. Halstead SB. Dengue in the Americas and Southeast Asia: do they differ? *Rev Panam Salud Publica Pan Am J Public Health*. 2006;20(6):407-15.
 16. Alava A, Mosquera C, Mosquera CE, Vargas W, Real J. Dengue en el Ecuador 1989-2002. *Rev. Ecuat. Hig y Med Trop*; 2005; 42: 11-29.
 17. Gutiérrez E, Real J, Alava A, Mosquera C. Epidemia de dengue hemorrágico en el Ecuador, 2003. *Rev Ecuat Hig Med Trop*. 2005;42:35-49.
 18. Ramudo SV. Estudios sobre el diagnóstico, la respuesta inmune humoral en humanos y la evaluación de la proteína prM como inmunógeno del virus dengue [Internet]. Editorial Universitaria; 2012 [citado 11 de enero de 2017]. Disponible en: <http://core.ac.uk/download/pdf/11816309.pdf>
 19. Roche RR, Alvarez M, Guzmán MG, Morier L, Kouri G. Comparison of Rapid Centrifugation Assay with Conventional Tissue Culture Method for Isolation of Dengue 2 Virus in C6/36-HT Cells. *J Clin Microbiol*. 9 de enero de 2000;38(9):3508-10.
 20. Regato M, Mosquera C, Coloma J, Mosquera C, Alava A. Aplicación de la RT-PCR de un solo paso en el diagnóstico y tipificación de las cepas circulantes del virus del dengue en el Ecuador. *Rev Hig Med Trop*. 2006;11-18.
 21. Lanciotti RS, Calisher CH, Gubler DJ, Chang GJ VA. Rapid detection and typing of dengue viruses from clinical samples by using reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol*. 1992;30(3):545-551.
 22. Harris E, Roberts TG, Smith L, Selle J, Kramer LD, Valle S, et al. Typing of dengue viruses in clinical specimens and mosquitoes by single-tube multiplex reverse transcriptase PCR. *J Clin Microbiol*. 1998;36(9):2634-9.
 23. Focus Diagnostics. Simplexa.TM. Dengue. REF MOL3100. Rev. C. A real-time RT-PCR assay for the in vitro detection and typing of dengue virus serotypes 1,2,3,4. PI-MOL3100-OUS-C[1]. doc - MOL3100.pdf [Internet]. [citado 24 de noviembre de 2016]. Disponible en: <https://www.focusdx.com/pdfs/pi/OUS/MOL3100.pdf>
 24. Regato M, Recarey R, Moratorio G, de Mora D, García-Aguirre L, González M, et al. Phylogenetic analysis of the NS5 gene of dengue viruses isolated in Ecuador. *Virus Res*. 2008;132(1-2):197-200.