#### UNIVERSIDAD INTERNACIONAL SEK

#### FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

Trabajo de Fin de Máster Titulado:

# Diseño de una plataforma de diagnóstico Filogenético para Flavivirus

Realizado por:

CATHERINE RAQUEL CARRERA CÓRDOVA

Director del proyecto:

Dr. Juan Carlos Navarro C., Ph.D.

Como requisito para la obtención del título de:

MAGISTER EN BIOMEDICINA

## **ANEXO B**

## **DECLARACION JURAMENTADA**

Yo, Catherine Carrera, con cédula de identidad 1715289367 declaro bajo juramento que el trabajo aquí desarrollado es de mi autoría, que no ha sido previamente presentado para ningún grado a calificación profesional; y, que he consultado las referencias bibliográficas que se incluyen en este documento.

A través de la presente declaración, cedo mis derechos de propiedad intelectual correspondientes a este trabajo, a la UNIVERSIDAD INTERNJACIONAL SEK,

según lo establecido por la Ley de Propiedad Intelectual, por su reglamento y por

la normativa institucional vigente.

FIRMA Y CÉDULA

1715289367

# **ANEXO C**

#### **DECLARATORIA**

El presente trabajo de investigación titulado:

# Diseño de una plataforma de diagnóstico Filogenético para Flavivirus

Realizado por:

Catherine Raquel CarreraCórdova

como Requisito para la Obtención del Título de:

MAGISTER EN BIOMEDICINA

ha sido dirigido por el profesor

JUAN CARLOS NAVARRO C.

quien considera que constituye un trabajo original de su autor

# **ANEXO D**

# LOS PROFESORES INFORMANTES

Los Profesores Informantes:

# LINO ARISQUETA HERRANZ

# JOSE RUBEN RAMÍREZ

Después de revisar el trabajo presentado,

lo han calificado como apto para su defensa oral ante

el tribunal examinador

**FIRMA** 

FIRMA

Quito, 11 de abril de 2022

# **ANEXO F**

## **DEDICATORIA**

A mis Padres, Raúl y Raquel, mi hermano Eduardo y mi sobrino Pablo

### **AGRADECIMIENTO**

A mi familia, por todo su apoyo.

A mis profesores del programa de Maestría, por compartir sus conocimientos.

# ANEXO F

Este trabajo de tesis fue realizado bajo el Programa de Investigación:

## SALUD GLOBAL

## FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

Proyecto DII-P011617\_2 (JCN)





Artículo de tesis

# Diseño de una plataforma de diagnóstico Filogenético para Flavivirus

#### Catherine Carrera-Córdova<sup>1</sup>, Juan-Carlos Navarro<sup>1,2</sup> \*

 ${}^{1}Universidad\ Internacional\ SEK,\ Maestría\ en\ Biomedicina,\ Facultad\ de\ Ciencias\ de\ la\ Salud;$ 

crcarrera.mbme@uisek.edu.ec; juancarlos.navarro@uisek.edu.ec

<sup>2</sup>Universidad Internacional SEK, Grupo de Enfermedades Emergentes, Desatendidas, Ecoepidemiología y Biodiversidad, Facultad de Ciencias de la Salud; <u>juancarlos.navarro@uisek.edu.ec</u>

Resumen: Los ARBOvirus (ARthropod BOrne Virus), son un grupo polifilético de virus transmitidos por artrópodos, ampliamente distribuidos que causan infecciones asintomáticas o enfermedades febriles en humanos en ciclos enzoóticos y urbanos. Informes recientes de infecciones en humanos causadas por Flavivirus han causado brotes de alta morbilidad y mortalidad. El Dengue, el arbovirus más importante en incidencia, prevalencia y mortalidad en el mundo, de origen zoonótico, amplia distribución, rápida propagación, es endémo-epidémico en Ecuador. Las formas y rutas de introducción favorecen su amplia distribución y lo convierten en una gran carga socioeconómica. Se diseñó una plataforma para identificación y diagnóstico molecular de flavivirus, incluido Dengue. Mediante el análisis filogenético de secuencias del gen NS5 bajo el algoritmo de Parsimonia Máxima los resultados corroboran la agrupación de estos de acuerdo con su vector, mostrando la separación en dos clados de virus transmitidos por artrópodos -garrapatas y mosquitos-, separados del grupo de virus sin vector conocido. Adicionalmente, como un clado intermedio, cercano a la raíz del árbol el Virus Ecuador Paraíso Escondido, aislado de flebótomo, separando los grupo de flavivirus transmitidos y no transmitidos por vectores. Se incluyen flavivirus nuevos de vertebrados de reciente detección, así como aquellos específicos insecto-específicos realizando una matriz de análisis inédita. Las topologías filogenéticas de las secuencias de los cuatro serotipos de Dengue de países del continente Americano indican un origen asiático para los serotipos 1, 2 y 3, y un origen asiático/africano para el serotipo 4. Adicionalmente, se infieren posibles introducciones y circulación entre el caribe y el cono sur, dependiendo del serotipo. Esta plataforma, creada con la finalidad de identificar miembros de la familia Flaviviridae y serotipos de virus Dengue, muestra el origen y distribución actual de los flavivirus y del virus del Dengue como base para análisis futuros frente a nuevos brotes o casos no identificados permitiendo el diagnóstico molecular de estos virus y de genotipos/linajes emergentes o reemergentes.

Palabras clave: Flavivirus, Dengue, serotipos, identificación molecular, genotipos/linajes reemergentes

**Abstract:** ARBOviruses (ARthropod BOrne Virus), are a polyphyletic group of viruses transmitted by arthropods, widely distributed that cause asymptomatic infections or febrile illnesses in humans in enzootic and urban cycles. Recent reports of infections in humans caused by Flaviviruses have caused outbreaks of high morbidity and mortality. Dengue, the most important arbovirus in incidence, prevalence and mortality in the world, of zoonotic origin, wide distribution, rapid spread, is endemic-epidemic in Ecuador. The forms and routes of introduction favor its wide distribution and

<sup>\*</sup>Autor de Correspondencia: <u>juancarlos.navarro@uisek.edu.ec</u>

make it a great socioeconomic burden. A platform for molecular identification and diagnosis of flaviviruses, including Dengue, was designed. Through the phylogenetic analysis of NS5 gene sequences under the Maximum Parsimony algorithm, the results corroborate the grouping of these according to their vector, showing the separation into two clades of viruses transmitted by arthropods -ticks and mosquitoes-, separated from the group of viruses no known vector. Additionally, as an intermediate clade, close to the root of the tree, the Ecuador Paraíso Escondido Virus, isolated from sandflies, separating the groups of vector-transmitted and non-vector-transmitted flaviviruses. New recently detected vertebrate flaviviruses are included, as well as those specific insect-specific ones, performing an unprecedented analysis matrix. The phylogenetic topologies of the sequences of the four Dengue serotypes from countries of the American continent indicate an Asian origin for serotypes 1, 2 and 3, and an Asian/African origin for serotype 4. Additionally, possible introductions and circulation between the Caribbean and the southern cone, depending on the serotype. This platform, created with the purpose of identifying members of the Flaviviridae family and Dengue virus serotypes, shows the origin and current distribution of flaviviruses and Dengue virus as a basis for future analyzes against new outbreaks or unidentified cases, allowing diagnosis of these viruses and emerging or re-emerging genotypes/lineages.

Keywords: Flavivirus, Dengue Virus, serotypes, identification, re-emerging genotypes/lineages

#### 1. Introducción

Los arbrovirus (ARthropod BOrne VIRUS) son un grupo de virus transmitidos por artrópodos con amplia distribución geográfica, asociada a la presencia de su vector (mosquito, garrapata, chinche, etc.). Causan infecciones asintomáticas o enfermedades febriles en humanos tanto en ciclos enzoóticos como urbanos; los informes recientes de brotes en humanos causados específicamente por miembros de la familia *Flaviviridae* (Dengue, Zika, Fiebre amarilla) han levantado las alertas en los organismos de salud pública a nivel mundial, principalmente en zonas tropicales, y han llevado a la re evaluación de los mecanismos de vigilancia y las medidas para controlar la transmisión de estos arbovirus por su alta morbilidad y mortalidad (Higuera & Ramírez, 2019).

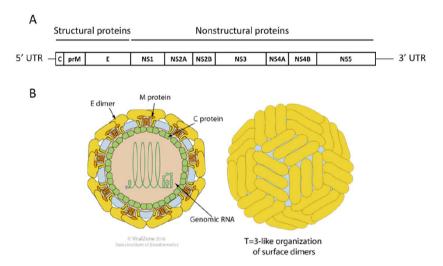
La rápida propagación mundial de virus como el dengue (DENV) y Zika (ZIKV) ha suscitado una gran preocupación internacional pues, se desconoce las rutas de entrada y el modo de expansión geográfica en el continente americano lo que ha ocasionado que las enfermedades que provocan se hayan convertido en una carga socioeconómica, concretamente en países donde el control de vectores es difícil debido a factores climáticos o de infraestructura (Campos et al., 2018). Por lo tanto, el análisis de las secuencias de genomas de flavivirus recolectadas en diferentes localidades a nivel mundial a lo largo del tiempo permite su correcta identificación e investigación de patrones de mutaciones acumuladas, así como su distribución geográfica permitiendo así entender sus mecanismos de dispersión y las interacciones entre su vector y huésped (Binder et al., 2019).

En los flavivirus se ha observado una variación genética significativa, dando lugar a diferentes linajes. Estos nuevos linajes están relacionados principalmente con la distribución y la dispersión geográfica, esto permite conocer los posibles orígenes y la dirección de expansión de cada tipo de virus y construir modelos predictivos sobre las regiones donde es probable que se produzcan infecciones activas en humanos (Higuera & Ramírez, 2019). Los flavivirus encuentran en todo el mundo y representan un número significativo de casos de enfermedades humanas.

La familia *Flaviviridae*, se compone por virus envueltos, con un genoma de ARN mono catenario de polaridad positiva, un marco de lectura abierto (ORF) y dos regiones flanqueantes no codificantes (en los extremos 5 'y 3'(**Fig.1-B**). Los genomas están delimitados en 5' y 3' por una cola de poli(A); poseen una

poliproteína de envoltura que es codificada por el ORF y luego procesada en tres proteínas estructurales: la envoltura (E), la cápside (C) y el precursor de la membrana (prM); además, siete proteínas no estructurales (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B y NS5) (Fig.1-A); el RNA de cadena sencilla se mantiene dentro de la cápside, que es de forma icosaédrica conformada a modo de bloques de proteínas de 12 kDa; la nucleocápside está rodeada por una membrana derivada de la célula al hospedador que contiene dos glicoproteínas virales (Fig.1). Su estrategia de replicación es similar en todos los miembros de la familia Flaviviridae a pesar de las diferencias significativas en el tropismo tisular de los diferentes miembros durante la transmisión y la patogénesis (Song et al, 2017; Lin et al, 2018; Noorbakhsh et al, 2019).

Los estudios previos que se han realizado para establecer la relación genética entre los virus del género Flavivirus comparando la filogenia molecular con el método serológico existente, se han realizado mediante el uso de una combinación de definiciones cuantitativas, como nivel de soporte de bootstrap y la identidad o las homologías de secuencias de nucleótidos. Los virus se clasifican en grupos, clados y especies. Se reconoce un antepasado putativo único del que evolucionaron dos ramas, grupos de virus no vectores y transmitidos por vectores, y de este último grupo surgieron grupos de virus transmitidos por garrapatas y transmitidos por mosquitos. Siempre que la teoría de la asociación de artrópodos como un rasgo adquirido fuera correcta, la identidad de la secuencia de nucleótidos entre estos tres grupos proporcionó datos de apoyo para la posibilidad de que el grupo no vector evolucionara primero, seguido de la separación de virus transmitidos por garrapatas y transmitidos por mosquitos. Los clados establecidos en el estudio propuesto por Kuno en 1998, se correlacionaron significativamente con los complejos antigénicos existentes (Kuno et al., 1998).



**Figura 1.** A: Esquema del ARN de flavivirus: Marco de lectura abierto único que codifica 3 proteínas estructurales y 7 no estructurales. Dos regiones no traducidas (UTR) en los extremos. B. Viriones envueltos de flavivirus, esféricos de 50 nm de diámetro y disposición en T de las proteínas de superficie M y E, de tipo icosaédrico. (Tomado de: Lin et al., 2018)

Sin embargo, también se han clasificado fenotípicamente a los flavivirus con base en sus interacciones con los humanos: los relacionados con infecciones humanas transmitidos por mosquitos y flavivirus transmitidos por garrapatas, incluido el virus de la fiebre amarilla (YFV), los serotipos del virus del dengue 1-4 (DENV-1 a DENV-4), el virus de la encefalitis japonesa (JEV), el virus del Nilo occidental (WNV) y las garrapatas el virus de la encefalitis transmitida por virus (TBEV) y que además son la causa de una alta morbilidad y mortalidad en todo el mundo y el segundo, los flavivirus no relacionados con infecciones humanas o animales como Culex flavivirus (CxFV), el virus del río Kamiti (KRV) y el virus del agente de fusión celular (CFAV), que han sido aislados de mosquitos o líneas celulares de mosquitos, sin asociación reconocida con vertebrados, enfermedad humana o animal caracterizada. De lo anterior, el segundo grupo

es de gran interés pues su identificación y caracterización permitirían la comprensión de las posibles interacciones en el hospedador mosquito con flavivirus patógenos así como la comprensión de su mecanismos de evolución (Evangelista et al., 2013).

Sobre la base de la secuenciación parcial de las regiones de los genes E y NS5, se han establecido relaciones filogenéticas entre los flavivirus, habiendo logrado diferenciar a flavivirus transmitidos por mosquitos, se conocen secuencias divergentes de las especies conocidas, con menos del 45 y el 71% de identidad de aminoácidos en los productos génicos E y NS5, respectivamente. El análisis filogenético de las secuencias de aminoácidos E y NS5 demuestra que los flavivirus se agrupan con flavivirus transmitidos por mosquitos (cita1).

Por lo expuesto, se hace imperativo solventar la necesidad de un diagnóstico e identificación rápidos, de preferencia durante la fase temprana de la enfermedad, fundamentada en técnicas moleculares que permitan levantar una plataforma de diagnóstico basada en secuencias reportadas tanto en banco de datos como las obtenidas por diagnóstico de laboratorio para el mejor entendimiento de la biología, epidemiología y procedencia de los flavivirus.

Las enfermedades causadas por varios flavivirus se han reconocido durante décadas, sino siglos; sin embargo, todavía se desconoce mucho y un ejemplo de ello es la experiencia reciente con el virus del Zika, que es además el único virus de esta familia considerado como agente teratógeno (Assif et al., 2017; Holbrook, 2017). El continente americano enfrenta una crisis de salud pública sin precedentes, esto es, epidemias concurrentes causadas por arbovirus como el virus del dengue (DENV), el virus Zika (ZIKV) que son transmitidos a los humanos por las hembras de mosquitos *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus*. En las últimas tres décadas, la distribución, la gravedad y la incidencia de DENV han aumentado en América Latina, de 16,4 casos por 100.000 habitantes en la década de 1980 a 71,5 casos por 100.000 habitantes del año 2000 al 2007 y las estimaciones de infección aparente por DENV en las Américas oscilan entre 1,5 millones y 13,3 millones de infecciones por año y, en 2015, se notificaron 2,35 millones de infecciones, lo que provocó 10.200 infecciones graves y 1.181 muertes (LaBeaud et al., 2011).

El virus Dengue, de origen zoonótico, y el arbovirus de mayor distribución y prevalencia en el mundo, comprende cuatro serotipos que comparten ciclos de transmisión comunes, exclusivamente los humanos como reservorios y hospedadores vertebrados de expansión. Basan su transmisión mediante hospedadores invertebrados o mosquitos vectores que viven en estrecha asociación con las personas como *Ae.* (*Stegomyia*) aegypti y *Ae.* (*Stegomyia*) albopictus, que son su vector secundario, su aparición coincide con el aumento de la urbanización, particularmente en Asia. Hoy en día la enfermedad dengue es hiperendémica en muchas regiones tropicales de Asia, donde 2 o más serotipos circulan de manera endémica y epidémica (Weber & Reisen, 2010).

Ecuador es susceptible a la introducción de arbovirus transmitidos por varios mosquitos vectores bien establecidos o recientemente introducidos y, por lo tanto, ha experimentado múltiples y repetidas introducciones de estas enfermedades. De estas, en la actualidad, solo la fiebre amarilla tiene una vacuna ampliamente disponible y autorizada (Douam & Ploss, 2018). En Ecuador, el dengue representa un problema endémo-epidémico prioritario en salud pública debido al alto número de casos reportados cada año. Desde su rebrote, a finales de 1988, se han registrado varios ciclos epidémicos en las zonas tropicales y subtropicales del país, habiéndose reportado la presencia de los cuatro serotipos del virus del dengue: DENV-1, DENV-2, DENV-3 y DENV-4 (MSP, 2022).

Las limitaciones en los sistemas de salud en áreas endémicas indudablemente conducen a una subestimación de la incidencia de arbovirus y complicaciones relacionadas. Sin embargo, la mejora de los diagnósticos y la mejor comprensión de los resultados secundarios relativos la infección ofrecerían hoy en día una ayuda para el control y la prevención de los arbovirus, que se mantienen como una alta prioridad, tanto por la carga actual de morbilidad como por la importante amenaza de la reaparición de estos virus entre grupos mucho más grandes de poblaciones susceptibles (LaBeaud et al., 2011). Por lo citado anteriormente, este trabajo se enfoca en diseñar una plataforma de diagnóstico molecular de flavivirus como el dengue, la fiebre amarilla, el zika y otros flavivirus representativos que hayan causado epidemias en América Latina y Ecuador, así como otros virus con evidencia de circulación enzoótica y, con potencial de introducción, con la finalidad de realizar una identificación óptima de los virus, con una mayor comprensión de la asignación e identificación de genotipos/linajes emergentes o reemergentes.

Nuestra hipótesis se basa en que el análisis filogenético de miembros de la familia *Flaviviridae* mostraría una estructura concordante con las relaciones entre los géneros a identificar, sus interacciones con los hospedadores, así como el origen geográfico que permite el reconocimiento específico de un virus en el proceso de diagnóstico.

#### 2. Materiales and Métodos

#### 2.1 Selección del gen NS5 como marcador para análisis e identificación de Flavivirus

Se seleccionó el gen NS5, que codifica para la proteína que funciona componente del complejo replicasa, la ARN polimerasa dependiente de ARN (RdRp) que interviene en la síntesis del genoma viral, y la ARN metiltransferasa (MTasa), que interviene en la modulación y evasión del sistema inmunitario (Bollati et al, 2010; Chong et al, 2019) y previamente utilizado en análisis anteriores por Kuno et al. (1998) y Gaunt et al, (2001).

#### 2.2 Muestreo y construcción de banco/matrices de secuencias

Se muestrearon los genomas disponibles para las especies representativas de Flavivirus a partir de la base de datos de *National Center for Bioinformatic Information (NCBI), GeneBank*. Específicamente, se utilizó el gen NS5- No estructural 5- de los virus más representativos a nivel de familia y de los cuatro serotipos de Dengue, se incluyeron principalmente secuencias de África, Asia, Europa, y el continente americano, en la cual se integró una secuencia/genotipo por cada país en el caso de estar disponible.

#### 2.3 Alineamiento de secuencias

Tanto el grupo de secuencias de la familia Flavivirus como el grupo de secuencias de Dengue fueron alineadas con el objetivo de construir una matriz de homología de secuencias mediante alineamiento múltiple con el algoritmo de CLUSTAL-W con un *gap opening penalty* de 15.00 y un gap extensión penalty de 10.00 con el software MEGA-X (Kumar et al, 2018)

Para el análisis general de la familia Flaviviridae se construyó una matriz de 76 secuencias x 11454 pares de bases del gen NS5. Se utilizó como grupos externos las secuencias víricas del gen NS5 de: *Cyclopterus lumpus* virus, Hamko virus, Kamiti river virus, Nienokoue virus, Nakiwogo virus, Palm Creek virus, Culex flavivirus, Culex theileri flavivirus, Quang Bing virus, Aedes Flavivirus, Cell fusing agent virus

Para el análisis del gen NS5 en los cuatro serotipos de Dengue se incluyeron secuencias procedentes del continente Americano, Asiático y Africano. Se utlizó la secuencia de dengue Selvático como raíz o grupo de referencia para los serotipos DENV 1, 2 y 3 así, para el serotipo I, DENV-1, se elaboró una matriz de 16 x 10826. El análisis del serotipo 2, DENV-2, se realizó a partir de una matriz 14 x 10848, compuesta por 13 secuencias con una longitud máxima de 10848pb, completando 14 secuencias para el análisis. La matriz para DENV-3, de 17 x 10736 se elaboró con 16 secuencias, completando 17 secuencias para el análisis, con una longitud máxima de 10736 pb. Finalmente, la matriz para el análisis del serotipo 4, DENV-4, de 10 x 10736 se construyó con 9 secuencias, esto debido a la poca información disponible para el gen NS5 para este serotipo. Se completó 10 secuencias para el análisis, con una longitud máxima de 10736pb, incluyendo en el análisis la secuencia de Dengue serotipo 1, DENV-1 como raíz del árbol.

#### 2.4 Análisis Filogenético

Los análisis filogenéticos fueron realizados a partir de las matrices de secuencias de ARN del gen NS5, previamente alineadas y se construyeron árboles filogenéticos mediante el método de parsimonia máxima

(MP), usando el programa MEGA y realizando un remuestreo de la matriz con 100 pseudo-réplicas de bootstrap para evaluar la robustez o apoyo de cada nodo, clado y taxas.

#### 3. Resultados y discusión

#### 3.1 Análisis filogenético de flavivirus

La historia evolutiva se infirió utilizando el método de Parsimonia Máxima. La longitud del árbol más parsimonioso fue igual a 54875. El índice de consistencia fue de 0,45; el índice de retención fue de 0,48 para todos los sitios y sitios informativos de parsimonia (entre paréntesis). El porcentaje de árboles replicados (Bootstrap) en los que los taxones asociados se agruparon en la prueba de arranque (100 repeticiones) se muestra junto a las ramas (Felsenstein, 1985).

El árbol MP (**Fig.2**) se obtuvo utilizando el algoritmo de corte y reconexión de ramas (*Tree-Bisection-Reconnection-* TBR) con nivel de búsqueda 1 en el que los árboles iniciales se obtuvieron mediante la adición aleatoria de secuencias (50 repeticiones) (Nei & Kumar, 2000). Las longitudes de las ramas se calcularon usando el método de ruta promedio y están en las unidades del número de cambios en toda la secuencia. Se muestran junto a las ramas. Este análisis involucró 76 secuencias de nucleótidos. Las posiciones de codón incluidas fueron 1ª+2ª+3ª+ Sin codificación. Hubo un total de 12198 posiciones en el conjunto de datos final.

El cladograma más parsimonioso corrobora para los genotipos de los flavivirus estudiados su distribución en la mayor del globo terrestre, también permite la identificación de dos grupos principales de flavivirus tomando en cuenta su origen monofilético, donde se podría caracterizar al grupo externo (Grupo A-GA) considerando sus vectores insectos artrópodos, mosquitos pertenecientes a la familia *Culicidae* en su mayoría. La segunda rama, permite una clasificación similar, así mismo en relación agrupación en relación con sus vectores mosquitos, garrapatas y también algunos mamíferos hospedadores (murciélagos, roedores) (**Fig. 2**).

En el primer grupo, el grupo externo (Grupo A) se subdivide en dos ramas, una vectorial (A1), que corresponde en su mayoría a virus transportados por mosquitos (culícidos del género *Aedes, Culex, y Anopheles*), exhibe también una amplia distribución geográfica, corrobrando su origen y distribución desde Asia y África, correlacionado también la presencia con su vector específico; así los genotipos asiáticos están representados por los virus Quanh Bing (*Culex tritaenion*) en Vietnam, Culex theileri (*Anopheles vagus*) en Indonesia, Culex flavivirus (*Culex pipiens*) de Japón, Nienkohue (*Culex sp.*) de Costa de Marfil, Nakiwogo (*Mansonia africana*) de Uganda, Aedes flavivirus (*Aedes albopictus*) de Japón, Kamiti virus (*Aedes machintoshi*) de África, Palm creek (*Coquilletidia xantogaster*) de Australia, Hanko (Mosquito) de Finlandia, en el continente americano Cell fusing agent (*Aedes aegypti*) de Argentina. La segunda rama(A2, flecha amarilla) corresponde a un virus no vectorial, reportado en Europa, en un vertebrado acuático, un pez, como hospedador del virus del mismo nombre, Cyclopterus lumpus (*Cyclopterus lumpus*) de Noruega, reportado por primera vez como causante de alteraciones en higado y riñones de su hospedador, y diferenciándose de otros flavivirus por el mecanismo de la traducción de la poli proteína completa debido a un cambio en el marco ribosomal 1 en el gen NS2A (Skoge et al 2018) (**Fig. 2**).

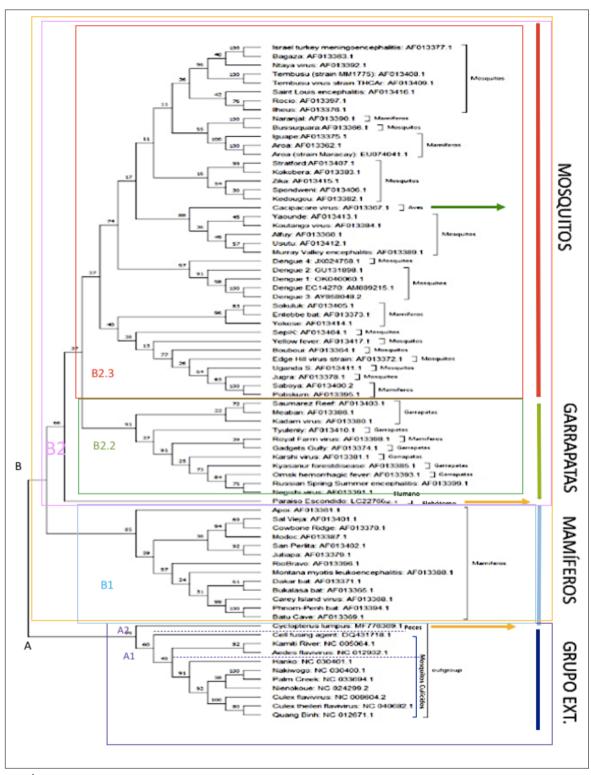
El segundo grupo (Grupo B) también tiene una sub ramificación similar, esto es, virus de hospedadores mamíferos (grupo B1) y se distribuyen en el continente africano siendo su hospedador un murciélago y en la región de centro y norte américa un roedor, con excepción del virus Apoi reportado en Japón cuyo hospedador es también un roedor. Trabajos previos reportan a este grupo de virus como NKV o virus de Vector no conocido, por sus siglas en ingles. Se conoce que los hospedadores de donde se aíslan los virus NKV no muestran síntomas de infección, lo que sugiere una infección persistente en estos organismos, producto de una posible rotación baja de estos virus (Gould et al, 2003).

Cercano a la raíz en el tercer grupo, se encuentra el virus de Ecuador, Paraíso Escondido(B2, flecha naranja), ubicado en una rama separada, dentro del grupo de los virus transmitidos por insectos, sugiriéndolo como un clado distinto y más ancestral que separa al grupo de los flavivirus no vectorizados de los flavivirus con artrópodos como vectores. Es el único flavivirus transmitido/aislado de una mosca de arena, manta blanca

o flebótomo (Psychodidae:Phlebotominae) (*Psathyromyia abonnenci*), endémica del continente americano (Alkan et al, 2015). **Fig. 2.** 

En el subgrupo que corresponde a los virus con vectores (B2), ya sean garrapatas (varias especies)(B2.2) o mosquitos (Culícidos del género *Anopheles*, *Culex*, y *Aedes*)(B2.3) correlaciona su con su vector el patrón de distribución geográfica amplio en todos los continentes. Sin embargo, dentro de este mismo grupo, en diferentes linajes se encuentran los virus Potiskum y Saboya, Entebe y Sokuluk, Iguape y Aroa que pese a estar reportados/aislados de su hospedador mamífero sea este roedor o murciélago no se ubican en el grupo de flavivirus NKV, lo que sucede también para el virus Negishi relacionado con el virus de la encefalitis Rusian Spring Summer y, cuyo hospedador es el humano. Esto podría abordarse de dos maneras: la primera, la coevolución de los virus con sus hospederos como un rasgo adquirido, aunque en la escala de tiempo no pueda ser respaldada (Gould et al, 2003) ó la segunda, la más aceptable, que su vector asociado aún no ha sido identificado y se conoce solo su hospedador, como en el caso de virus Cacipacore (B2.3, flecha verde) aislado por primera vez en su hospedador, el ave *Percnostolla rufifroms y* del que recientemente han sido recuperados aislados virales en mosquitos de Brasil como *Aedes aegypti, Culex sp. y Anopheles sp.*, (Figueiredo et al, 2017). así como un reciente aislado de garrapatas (*Amblyomma cajennense*) recolectadas de un capibara (*Hydrochoerus hydrochaeris*) enfermo en el estado de São Paulo, Brasil (de Figueiredo et al, 2017), destacando una posible condición vectorial.

El presente análisis por MP, presenta resultados similares a los obtenidos por Kuno en 1998, mediante ML al agrupar a los flavivirus de acuerdo a sus vectores y en forma interna, la separación de dos clados, los virus transmitidos por garrapatas y mosquitos y, de igual manera plantea como un clado intermedio al grupo NKV (Kuno et al, 1998).



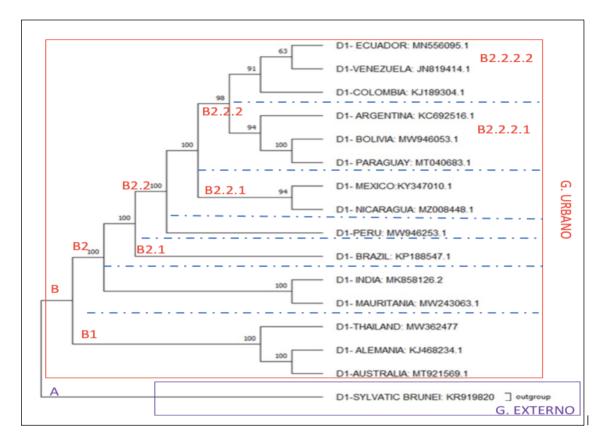
**Figura 2**. Árbol filogenético de la familia Flaviviridae, inferido mediante el método de Parsimonia Máxima, en el análisis del gen NS5. Se observa el grupo externo que define la base del árbol y la posición subsecuente de cada flavivirus en relación con su vector asociado..

#### 3.2 Análisis filogenético de Dengue

Para los cuatro serotipos de Dengue la historia evolutiva se infirió utilizando el método de Parsimonia Máxima. Se muestran en cada uno de los serotipos el árbol más parsimonioso, su longitud, el índice de consistencia, el índice de retención y el índice compuesto para todos los sitios y sitios informativos de parsimonia (entre paréntesis). El porcentaje de árboles replicados en los que los taxones asociados se agruparon en la prueba de arranque (100 repeticiones) se muestra junto a las ramas. El árbol MP se obtuvo utilizando el algoritmo de Corte y reconexión de ramas, *Tree-Bisection-Regrafting* (TBR) con nivel de búsqueda 1 en el que los árboles iniciales se obtuvieron mediante la adición aleatoria de secuencias (50 repeticiones). Las longitudes de las ramas se calcularon usando el método de ruta promedio y están en las unidades del número de cambios en toda la secuencia. (Figs. 1, 2,3.4) (Nei & Kumar, 2000)

#### **DENV-1**

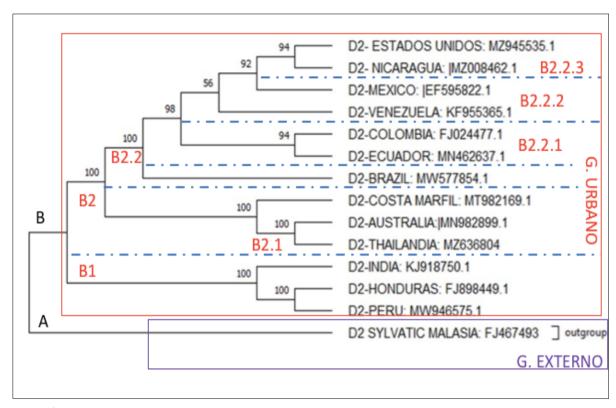
Con base en la topología del árbol (**Fig. 3**), se distinguen dos ramas principales, considerando la primera, al genotipo de Dengue Selvático, designado como grupo externo (A), agrupando en forma monofilética todas las secuencias urbanas de DENV1(B). Como un grupo basal dentro de las secuencias urbanas DENV-1 se encuentran como secuencias hermanas las secuencias de Alemania (que fue reportada como introducida desde Sri Lanka) y Australia que estarían relacionadas con Tailandia (B1) como consecuencia de una posible introducción, adaptación y reintroducción de DENV-1 en estos lugares. En la siguiente rama interna (B2) se puede apreciar las secuencias de DENV1 de India (Asia) y Mauritania (África) relacionadas desde la base de este nodo, con todo el grupo de secuencias del continente Americano sugiriendo una posible introducción en América desde Asia/África, pudiendo comenzar su introducción en Brasil (B2.1), continuando a Perú, desde donde se distribuye a Honduras y México (B2.2.1) como un posible evento de co-circulación, al igual que Bolivia y Uruguay desde donde probablemente se introdujo al Argentina (B2.2.2.1) y una posible introducción desde el cono sur a Colombia y subsecuentemente introducido a Venezuela y Ecuador generando otro evento de co-circulación de este serotipo(B2.2.2.2).



*Figura 3.* Árbol filogenético del Virus Dengue serotipo 1, inferido mediante el método de Parsimonia Máxima en el análisis del gen NS5, con secuencia de Dengue selvático como raíz del árbol. Longitud = 4234; índice de consistencia es (0,59); el índice de retención (0,69) y el índice compuesto es 0,51 (0,41)

#### **DENV-2**

La topología de DEN-2 (**Fig. 4**) permite distinguir dos ramas principales, considerando la primera, al genotipo de Dengue Selvático (A), designado como grupo externo y, como grupo interno y monofilético los genotipos urbanos de DENV2(B). Para este grupo, los genotipos urbanos DENV-2- de Perú y Honduras se ubican cercanos a la raíz indicando una posible co circulación entre Centro y Sudamérica (B1), estos genotipos están conectados a su vez con el genotipo de DENV- 2 de la India indicando una posible primera de introducción desde India (Asia) hacía Perú (América); este primer nodo guarda relación con todo el resto de genotipos sin embargo, en los nodos internos se puede distinguir los genotipos de África (Costa de Marfil), Asia (Tailandia) y Australia relacionadas entre sí en un mismo subgrupo, sugerente de una posible introducción y reintroducción en estos países (B2.1). La segunda introducción en el continente americano pudo ser desde África hacia Brasil (B2.2), desde donde pudo dispersarse e introducirse a Ecuador y Colombia (B2.2.1), luego a Venezuela (B2.2.2), México y Estados Unidos y Nicaragua ((B2.2.3).



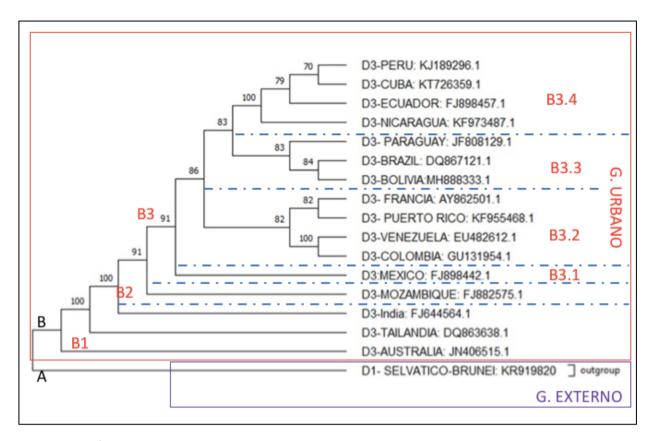
**Figura 4.** Árbol filogenético del Virus Dengue serotipo 2, inferido mediante el método de Parsimonia Máxima, en el análisis del gen NS5 con secuencia de Dengue selvático como raíz del árbol. El índice de consistencia es (0,62), el índice de retención es (0,73) y el índice compuesto es 0,53 (0,45) para todos los sitios y sitios informativos de parsimonia.

#### DENV-3

La topología del árbol MP de DENV-3 que se muestra en la Figura 5, permite distinguir, al igual que en los serotipos 1 y 2, dos ramas principales: el genotipo de Dengue Selvático serotipo 1, considerado como grupo externo (A) y, los genotipos urbanos de DENV3 agrupados monofiléticamente en la rama interna con algunas dicotomías (B).

Los genotipos urbanos DENV-3 que se ubican en las ramas basales de este clado (**Fig. 5**), corresponden a Australia, Asia (Tailandia e India), cada uno en una rama distinta como posible indicativo de una baja circulación (B2); sin embargo, en un nodo más interno se observa agrupados los genotipos de África (Mozambique) y América (B3). En este último grupo, el genotipo de México (B3.1) está más cercano a la base y a continuación en un nodo más interno se encuentran dos grupos: el primero comprende los genotipos de Colombia y Venezuela, los cuales se agrupan con Estados Unidos (Puerto Rico) y Francia (genotipo reportado como introducido por un viajero que transitó por Senegal, Guinea y Sierra Leona)(B3.2).

El segundo grupo está compuesto por los genotipos de la región ubicada al Este de Suramérica, Bolivia y Brasil como genotipos hermanos, relacionados con Paraguay, estos agrupados en un mismo subclado (B3.3) y, en otro, los genotipos de Nicaragua y Ecuador, junto con Cuba y Perú como genotipos hermanos (B3.4). Lo anterior nos demuestra una introducción del genotipo DENV3 desde África a Europa y apoyaría la hipótesis de introducción de DENV3 desde África hacia América también. Se evidencia una relación entre Bolivia y el cono sur, junto con dos eventos de co- circulación en el Caribe y Centro América con una introducción de DENV-3 desde Ecuador hacia Perú (**Fig. 5**).

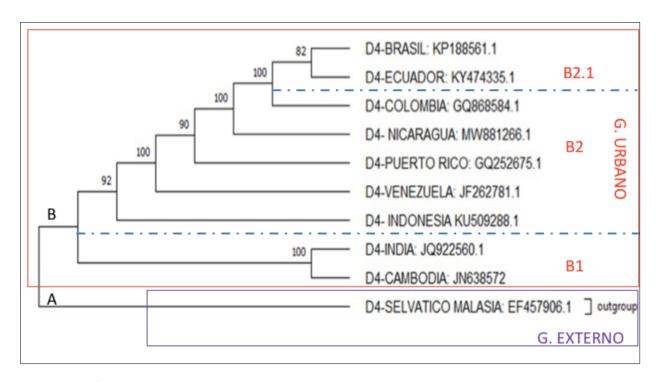


**Figura 5.** Árbol filogenético del Virus Dengue serotipo 3, inferido mediante el método de Parsimonia Máxima, en el análisis del gen NS5 con secuencia de Dengue selvático 1 como raíz del árbol. Se muestra el árbol #1 de 6 árboles más parsimoniosos (longitud = 4604). El índice de consistencia es (0,63), el índice de retención es (0,59) y el índice compuesto es 0,51 (0,375) para todos los sitios y sitios informativos de parsimonia.

#### **DENV-4**

La topología del árbol de DENV-4 permite distinguir en la Figura 6, dos diferentes ramas principales: los genotipos urbanos (B), en donde se puede apreciar mas diferenciación y, el genotipo de Dengue Selvático serotipo 4 de origen Asiático (Malasia)(A), que fue considerado como grupo externo.

En la base del grupo urbano se encuentran los genotipos de África (Cambodia) y Asia (India)(B1) En un nodo más interno, el genotipo de Indonesia (Asia) se relaciona con el resto de las secuencias del continente americano indicando así la introducción y adaptación del genotipo asiático de DENV-4 en el continente americano (B2). De este último grupo los genotipos más cercano a raíz del árbol corresponden a Venezuela, Estados Unidos (Puerto Rico), Nicaragua y Colombia (B2), que estaría más relacionado con los genotipos de Ecuador y Brasil (B2.1), con una posible introducción desde Brasil hacia Ecuador, siendo estos dos, genotipos hermanos y los más distantes del genotipo selvático, lo anterior puede significar una circulación en sentido desde la región de Caribe hacia Centro América y luego a Sudamérica.



**Figura 6**: Árbol filogenético del Virus Dengue serotipo 4, inferido mediante el método de Parsimonia Máxima, producto del análisis del gen NS5 con DENV-4 selvático como raíz del árbol. Se muestra el árbol más parsimonioso con longitud = 3333. El índice de consistencia es (0,59), el índice de retención es (0,58) y el índice compuesto es 0,45 (0,35) para todos los sitios y sitios informativos de parsimonia.

En este trabajo se construyó una matriz para el análisis filogenético de máxima parsimonia. Muestreando los genotipos de los principales flavivirus usando secuencias del gen NS5, se encontraron asociaciones entre las características epidemiológicas y ecológicas de cada flavivirus en correlación con la topología, estas coinciden con los análisis filogenéticos realizados previamente (Kuno, et al,1998) así como el análisis previo del gen NS5 (Gaunt et al. 2001); comparados con el análisis realizado en el presente trabajo, corroboran la correlación entre las relaciones filogenéticas ya inferidas para los diferentes Flavivirus, junto con sus características epidemiológicas y ecológicas del análisis de secuencias aminoacídicas (Fajardo, 2016). La matriz de diagnóstico construida evidencia, clados o grupos separados, que han sido definidos y caracterizados previamente: ISFV, TBFV, NKV y MBFV, pero sobretodo se identifican por su asociación con su hospedador o vector específico, mosquitos y garrapatas, quedando un remanente del que no se conoce su hospedador.

Por su parte, el dengue que es endémo-epidmémico o hiperendémico, y en muchas regiones tropicales del globo circulan 2 o más serotipos de manera simultánea (Weber & Reisen, 2010); se cree que el DENV probablemente fue introducido en las Américas en el siglo XVII, la aparición de DENV hiperendémico en el hemisferio occidental ocurrió posteriormente, como consecuencia de la suspensión de una campaña, en su momento exitosa, para erradicar *Ae. aegypti* para el control de la fiebre amarilla en las Américas entre 1950 a 1970. *Ae. aegypti* recolonizó rápidamente casi todos el neotrópico y áreas subtrópicales, con la consecuente invasión de DENV. La introducción en 1985 de *Ae. Albopictus* en los EE. UU y Brasil desde Asia, proporcionaron un vector secundario para la transmisión del DENV en las Américas, convirtiéndose en el principal vector de DENV durante un brote en Hawái (Effler et al., 2005; Weber & Reisen, 2010).

El incremento de vuelos y aumento de las actividades comerciales en la región de América probablemente generan intercambios frecuentes e importación de DENV a través del movimiento humano, por lo que el aumento de la transmisión del dengue en las Américas y Asia favorece el intercambio frecuente de serotipos y linajes virales entre los países de América Latina y una co circulación persistente de los mismos dentro de cada país (Jiménez-Silva et al, 2018).

El análisis de secuencias es una herramienta clave en la identificación del virus dengue, un análisis previo de Regato et al. (2008) con secuencias parciales del gen NS5, las cepas de DENV1 aisladas en Argentina y Paraguay se agrupan en dos clados diferentes: uno relacionado filogenéticamente con genotipos de Brasil y otro con genotipos de Paraguay y el noreste de Argentina. Los resultados de nuestro análisis coinciden con lo encontrado por Regato et al. (2008) infiriendo en ambos análisis una relación genética más distante con cualquiera de los dos clados de DENV1 que circulan en otros países sudamericanos, dando a entender que los DENV1 que circulan en Ecuador son genéticamente distintos (Regato et al. 2008), salvo por su proximidad con el genotipo venezolano derivada del presente análisis.

En el caso de DENV2, las cepas ecuatorianas estudiadas por Regato et al., (2008) se agrupan con cepas aisladas en la región del Caribe y América del Sur, en nuestro estudio se ubican en un mismo clado, estrechamente relacionada con el genotipo colombiano, y separado del clado que incluye a Venezuela, México, Nicaragua y Estados Unidos .

En estudios previos el examen directo de las secuencias de aminoácidos de NS5 de las cepas ecuatorianas de DENV3 reveló una similitud del 100 % con la cepa originaria de Sri Lanka, respaldando el origen en Sri Lanka del linaje DENV3 y la propagación de este linaje genético en Ecuador. Adicionalmente, este linaje DENV3 fue identificado en cuatro brotes epidémicos diferentes en 2000, 2001, 2003 y 2004 lo que sugiere que los virus de origen del sudeste asiático pueden adaptarse y persistir en las condiciones ecoepidemiológicas de América del Sur (Regato et al. 2008)

El serotipo DENV-4, del que se conoce su origen asiático, se reportó por primera vez en las Américas en 1981 (Lanciotti et al., 1997). Sin embargo, un aislado de DENV4 en Ecuador durante el año 2008 sugiere una relación filogenética cercana con cepas aisladas en Dominica y una relación genética más distante con cepas aisladas en el sudeste asiático, pese a esto también existe evidencia que en Ecuador circulan cepas de DENV4 de origen distinto al antillano (Regato et al. 2008). Nuestro análisis por su parte sugiere una relación mas estrecha con el genotipo brasileño, aludiendo así, a su probable origen asiático.

Cada cladograma presentado tanto para la familia Flaviviridae, asi como para cada uno de los serotipos de DEN-V, es producto del análisis de secuencias escogidas al azar mediante Parsimonia Máxima, de modo que constituyen una hipótesis modificable/falseable del origen y actual distribución de los flavivirus y del virus del Dengue. Se considera por tanto, una plataforma creada con la finalidad de identificar miembros de la familia Flaviviridae y serotipos de virus Dengue por lo que los resultados obtenidos se interpretan en función de la información que alimente un nuevo análisis frente a un nuevo brote, y que permita identificar un aislado en particular o secuencias nuevas, que al ubicarse en nodos específicos permitan su identificación y análisis epidemiológico, así como de identificar patrones de introducción, co circulación o re introducción en base a las topologías presentadas.

#### 4. Conclusiones

Los flavivirus son los agentes potencialmente mortales que generan altas tasas de morbilidad y mortalidad en el mundo, la identificación y el diagnóstico temprano y preciso de las infecciones son importantes para la atención y, adecuado direccionamiento de un paciente frente a la infección.

La matriz de diagnóstico generada a partir del muestreo de secuencias/genotipos del gen NS5 de Flavivirus y de cada uno de los serotipos de Dengue, analizados filogenéticamente mediante el método de parsimonia máxima, permitió identificar en clados apoyados los flavivirus presentes en casi todo el mundo. En el caso especifico de Dengue, la matriz de secuencias del gen NS5 resultó útil en la identificación de cada uno de los serotipos, además de sus posibles relaciones y patrones de distribución circulación, co-circulación, introducción y re-introducción.

Se incluyeron flavivirus nuevos de vertebrados de reciente detección, así como aquellos específicos insectoespecíficos realizando una matriz de análisis inédita. Las topologías filogenéticas de las secuencias de los cuatro serotipos de Dengue de países del continente Americano indican un origen asiático para los serotipos 1, 2 y 3, y un origen asiático/africano para el serotipo 4. Adicionalmente, se infieren posibles introducciones y circulación entre el caribe y el cono sur, dependiendo del serotipo. Esta plataforma, creada con la finalidad de identificar miembros de la familia Flaviviridae y serotipos de virus Dengue, muestra el origen y distribución actual de los flavivirus y del virus del Dengue como base para análisis futuros frente a nuevos brotes o casos no identificados permitiendo el diagnóstico molecular de estos virus y de genotipos/linajes emergentes o reemergentes.

De lo anterior se infiere que el gen NS5 es un marcador óptimo para la identificación y diagnóstico molecular de esta familia y que la matriz de secuencias permitirá ser utilizada como una plataforma confiable ubicar e identificar secuencias específicas y en un momento epidemiológico específico.

Contribución de los Autores: "Conceptualización JCN; metodología CC-C; software JCN, CC-Cvalidación; análisis formal; recursos JCN, CC-C; curadoría de data CC-C, escritura—preparación de borrador o draft original, CC-C.; escritura—revisión y edición, CC-C, JCN.; visualización final, JCN, CC-C.; supervisión, JCN.; administración y gestión de proyecto, JCN.; adquisición de fondos, JCN. "Todos los autores han leído y están de acuerdo con la versión final del manuscrito".

Financiamiento/Fondos: DII-UISEK-P011617\_2 (JCN)

Conflictos de Interés: Los autores declaran no tener conflicto de interés.

#### Referencias citadas

- 1. Asif, A., Manzoor, S., Tuz-Zahra, F., Saalim, M., Ashraf, M., Ishtiyaq, J., & Khalid, M. (2017). Zika Virus: Immune Evasion Mechanisms, Currently Available Therapeutic Regimens, and Vaccines. Viral immunology, 30(10), 682–690. https://doi.org/10.1089/vim.2017.0046
- 2. Alkan C, Zapata S, Bichaud L, Moureau G, Lemey P, Firth AE, Gritsun TS, Gould EA, de Lamballerie X, Depaquit J, Charrel RN. Ecuador Paraiso Escondido Virus, a New Flavivirus Isolated from New World Sand Flies in Ecuador, Is the First Representative of a Novel Clade in the Genus Flavivirus. J Virol. 2015 Dec;89(23):11773-85. doi: 10.1128/JVI.01543-15. Epub 2015 Sep 9. PMID: 26355096; PMCID: PMC4645344.
- 3. Asif, A., Manzoor, S., Tuz-Zahra, F., Saalim, M., Ashraf, M., Ishtiyaq, J., & Khalid, M. (2017). Zika Virus: Immune Evasion Mechanisms, Currently Available Therapeutic Regimens, and Vaccines. Viral immunology, 30(10), 682–690. https://doi.org/10.1089/vim.2017.0046
- Binder, L. C., Tauro, L. B., Farias, A. A., Labruna, M. B., & Diaz, A. (2019). Molecular survey of flaviviruses and orthobunyaviruses in Amblyomma spp. ticks collected in Minas Gerais, Brazil. Revista brasileira de parasitologia veterinaria = Brazilian journal of veterinary parasitology: Orgao Oficial do Colegio Brasileiro de Parasitologia Veterinaria, 28(4), 764–768. <a href="https://doi.org/10.1590/S1984-29612019071">https://doi.org/10.1590/S1984-29612019071</a>
- 5. Bollati, M., Alvarez, K., Assenberg, R., Baronti, C., Canard, B., Cook, S., Coutard, B., Decroly, E., de Lamballerie, X., Gould, E. A., Grard, G., Grimes, J. M., Hilgenfeld, R., Jansson, A. M., Malet, H., Mancini, E. J., Mastrangelo, E., Mattevi, A., Milani, M., Moureau, G., ... Bolognesi, M. (2010). Structure and functionality in flavivirus NS-proteins: perspectives for drug design. Antiviral research, 87(2), 125–148. https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2009.11.009
- 6. Campos, T. L., Durães-Carvalho, R., Rezende, A. M., de Carvalho, O. V., Kohl, A., Wallau, G. L., & Pena, L. J. (2018). Revisiting Key Entry Routes of Human Epidemic Arboviruses into the Mainland Americas through Large-Scale Phylogenomics. International journal of genomics, 2018, 6941735. https://doi.org/10.1155/2018/6941735

- 7. Chong, H. Y., Leow, C. Y., Abdul Majeed, A. B., & Leow, C. H. (2019). Flavivirus infection-A review of immunopathogenesis, immunological response, and immunodiagnosis. Virus research, 274, 197770. <a href="https://doi.org/10.1016/j.vi-rusres.2019.197770">https://doi.org/10.1016/j.vi-rusres.2019.197770</a>
- 8. Douam, F., & Ploss, A. (2018). Yellow Fever Virus: Knowledge Gaps Impeding the Fight Against an Old Foe. Trends in microbiology, 26(11), 913–928. https://doi.org/10.1016/j.tim.2018.05.012
- 9. de Figueiredo, G.G., Amarilla, A.A., de Souza, W.M. *et al.* Genetic characterization of Cacipacoré virus from ticks collected in São Paulo State, Brazil. *Arch Virol* **162**, 1783–1786 (2017). https://doi.org/10.1007/s00705-017-3279-3
- 10. Effler, P. V., Pang, L., Kitsutani, P., Vorndam, V., Nakata, M., Ayers, T., Elm, J., Tom, T., Reiter, P., Rigau-Perez, J. G., Hayes, J. M., Mills, K., Napier, M., Clark, G. G., Gubler, D. J., & Hawaii Dengue Outbreak Investigation Team (2005). Dengue fever, Hawaii, 2001-2002. *Emerging infectious diseases*, 11(5), 742–749. https://doi.org/10.3201/eid1105.041063
- 11. Evangelista, J., Cruz, C., Guevara, C., Astete, H., Carey, C., Kochel, T. J., Morrison, A. C., Williams, M., Halsey, E. S., & Forshey, B. M. (2013). Characterization of a novel flavivirus isolated from Culex (Melanoconion) ocossa mosquitoes from Iquitos, Peru. The Journal of general virology, 94(Pt 6), 1266–1272. https://doi.org/10.1099/vir.0.050575-0
- 12. Fajardo A. (2016). Epidemiología molecular de Flavivirus emergentes en Uruguay y las Américas: Virus Dengue y Zika. [Tesis doctoral Universidad de la República del Paraguay]. Universidad de la República (Uruguay). Facultad de Ciencias. 225 pp.
- 13. Felsenstein J. (1985). Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. Evolution 39:783-791
- 14. Figueiredo, M., Amarilla, A. A., Figueiredo, G. G., Alfonso, H. L., Lippi, V., Maia, F., Morais, F. A., Costa, C., Henriques, D. A., Durigon, E. L., Figueiredo, L., & Aquino, V. H. (2017). Cacipacore virus as an emergent mosquito-borne Flavivirus. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 50(4), 539–542. https://doi.org/10.1590/0037-8682-0485-2016
- 15. Gaunt, M. W., Sall, A. A., Lamballerie, X., Falconar, A., Dzhivanian, T. I., & Gould, E. A. (2001). Phylogenetic relationships of flaviviruses correlate with their epidemiology, disease association and biogeography. The Journal of general virology, 82(Pt 8), 1867–1876. https://doi.org/10.1099/0022-1317-82-8-1867
- 16. Gould, E. A., de Lamballerie, X., Zanotto, P. M., & Holmes, E. C. (2003). Origins, evolution, and vector/host coadaptations within the genus Flavivirus. Advances in virus research, 59, 277–314. <a href="https://doi.org/10.1016/s0065-3527(03)59008-x">https://doi.org/10.1016/s0065-3527(03)59008-x</a>
- 17. Higuera, A., & Ramírez, J. D. (2019). Molecular epidemiology of dengue, yellow fever, Zika and Chikungunya arboviruses: An update. Acta tropica, 190, 99–111. <a href="https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2018.11.010">https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2018.11.010</a>
- 18. Holbrook M. R. (2017). Historical Perspectives on Flavivirus Research. Viruses, 9(5), 97. <a href="https://doi.org/10.3390/v9050097">https://doi.org/10.3390/v9050097</a>
- 19. Jiménez-Silva, C. L., Carreño, M. F., Ortiz-Baez, A. S., Rey, L. A., Villabona-Arenas, C. J., & Ocazionez, R. E. (2018). Evolutionary history and spatio-temporal dynamics of dengue virus serotypes in an endemic region of Colombia. PloS one, 13(8), e0203090. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0203090
- 20. Kumar S., Stecher G., Li M., Knyaz C., and Tamura K. (2018). MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. Molecular Biology and Evolution 35:1547-1549.
- 21. Kuno, G., Chang, G. J., Tsuchiya, K. R., Karabatsos, N., & Cropp, C. B. (1998). Phylogeny of the genus Flavivirus. Journal of virology, 72(1), 73–83. <a href="https://doi.org/10.1128/JVI.72.1.73-83.1998">https://doi.org/10.1128/JVI.72.1.73-83.1998</a>

- 22. Labeaud, A. D., Bashir, F., & King, C. H. (2011). Measuring the burden of arboviral diseases: the spectrum of morbidity and mortality from four prevalent infections. Population health metrics, 9(1), 1. <a href="https://doi.org/10.1186/1478-7954-9-1">https://doi.org/10.1186/1478-7954-9-1</a>
- 23. Lin, H. H., Yip, B. S., Huang, L. M., & Wu, S. C. (2018). Zika virus structural biology and progress in vaccine development. Biotechnology advances, 36(1), 47–53. <a href="https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2017.09.004">https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2017.09.004</a>
- 24. Ministerio de Salud Pública del Ecuador,. (s. f.). Ecuador en alerta para prevenir el contagio del dengue. MSP. Recuperado 21 de enero de 2022, de <a href="https://www.salud.gob.ec/estrategia-nacional-de-control-del-den-gue/#:~:text=El%20impacto%20de%20esta%20enfermedad,%2D3%20y%20DEN%2D4">https://www.salud.gob.ec/estrategia-nacional-de-control-del-den-gue/#:~:text=El%20impacto%20de%20esta%20enfermedad,%2D3%20y%20DEN%2D4</a>
- 25. Nei M. and Kumar S. (2000). Molecular Evolution and Phylogenetics. Oxford University Press, New York.
- 26. Noorbakhsh, F., Abdolmohammadi, K., Fatahi, Y., Dalili, H., Rasoolinejad, M., Rezaei, F., Salehi-Vaziri, M., Shafiei-Jandaghi, N. Z., Gooshki, E. S., Zaim, M., & Nicknam, M. H. (2019). Zika Virus Infection, Basic and Clinical Aspects: A Review Article. Iranian journal of public health, 48(1), 20–31.
- 27. Regato, M., Recarey, R., Moratorio, G., de Mora, D., Garcia-Aguirre, L., Gónzalez, M., Mosquera, C., Alava, A., Fajardo, A., Alvarez, M., D' Andrea, L., Dubra, A., Martínez, M., Khan, B., & Cristina, J. (2008). Phylogenetic analysis of the NS5 gene of dengue viruses isolated in Ecuador. Virus research, 132(1-2), 197–200. <a href="https://doi.org/10.1016/j.virusres.2007.10.012">https://doi.org/10.1016/j.virusres.2007.10.012</a>
- 28. Skoge RH, Brattespe J, Økland AL, Plarre H, Nylund A. New virus of the family Flaviviridae detected in lumpfish (Cyclopterus lumpus). Arch Virol. 2018 Mar;163(3):679-685. doi: 10.1007/s00705-017-3643-3. Epub 2017 Nov 17. PMID: 29147783; PMCID: PMC5814470.
- 29. Song, B. H., Yun, S. I., Woolley, M., & Lee, Y. M. (2017). Zika virus: History, epidemiology, transmission, and clinical presentation. Journal of neuroimmunology, 308, 50–64. <a href="https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2017.03.001">https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2017.03.001</a>
- 30. Weaver, S. C., & Reisen, W. K. (2010). Present and future arboviral threats. Antiviral research, 85(2), 328–345. https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2009.10.008

**Anexo 1.**Tabla de secuencias y códigos de acceso GenBank utilizados (Flavivirus)

	SECUENCIAS DE FLAVIVIRUS UTILIZADAS								
No.	Nombre	No. Aceso Gene Bank	No.	Nombre	No. Aceso Gene Bank				
1	Aedes Flavivirus	NC 012932.1	39	Kyasanur Forest disease	AF013385.1				
2	Alfuy (MRM-3929)	AF013360.1	40	Meaban	AF013386.1				
3	Apoi	AF013361.1	41	Modoc	AF013387.1				
4	Aroa (VenA-1809)	AF013362.1	42	Montana myotis leukoencepalitis	AF013388.1				
5	Aroa virus strain Maracay	EU074041.1	43	Murray Valley encephalitis	AF013389.1				
6	Bagaza	AF013363.1	44	Nakiwogo	NC 030400.1				
7	Batu Cave	AF013369.1	45	Naranjal	AF013390.1				
8	Bouboui	AF013364.1	46	Negishi	AF013391.1				
9	Bukalasa bat	AF013365.1	47	Ninenokoue	NC 024299.2				
10	Bussuquara	AF013366.1	48	Ntaya (original)	AF013392.1				
11	Cacipacore	AF013367.1	49	Omsk hemorrhagic fever	AF013393.1				
12	Carey Island	AF013368.1	50	Palm Creek	NC 033694.1				
13	Cell fusing agent	DQ431718.1	51	Paraiso Escondido	LC227602.1				
14	Cowbone Ridge	AF013370.1	52	Phnom Penh bat	AF013394.1				
15	Culex flavivirus	NC 008604.2	53	Potiskum	AF013395.1				
16	Culex theileri flavivirus	NC 040682.1	54	Quang Binh virus	NC 012671.1				
17	Cyclopterus lumpus	MF776369.1	55	Rio Bravo	AF013396.1				
18	Dakar bat	AF013371.1	56	Rocio	AF013397.1				
19	DENGUE EC 14270	AM889215.1	57	Royal Farm	AF013398.1				
20	Dengue type 1	OK040060.1	58	Russian spring summer encephalitis	AF013399.1				
	Dengue type 2	GU131898.1	59	Saboya	AF013400.2				
22	Dengue type 3	AY858048.2	60	Sal Vieja (38TWM-106)	AF013401.1				
23	Dengue type 4	JX024758.1	61	San Perlita	AF013402.1				
24	Edge Hill	AF013372.1	62	Saumarez Reef	AF013403.1				
25	Entebbe bat	AF013373.1	63	Sepik (MK 7148)	AF013404.1				
26	Gadgets Gully	AF013374.1	64	Sokuluk	AF013405.1				
27	Hanko	NC 30401.1	65	Spondweni	AF013406.1				
28	Iguape	AF013375.1	66	St. Louis encephalitis	AF013416.1				
29	Ilheus	AF013376.1	67	Stratford	AF013407.1				
30	Israel turkey meningoencephalitis	AF013377.1	68	Tembusu strain THCAr	AF013409.1				
	Jugra	AF013378.1		Tembusu (MM 1775)	AF013408.1				
32	Jutiapa	AF013379.1	70	Tyuleniy	AF013410.1				
33	Kadam	AF013380.1	71	Uganda S	AF013411.1				
34	Kamiti River	NC005064.1	72	Usutu	AF013412.1				
35	Karshi	AF013381.1	73	Yaounde	AF013413.1				
36	Kedougou	AF013382.1	74	Yellow fever	AF013417.1				
37	Kokobera	AF013383.1	75	Yokose	AF013414.1				
38	Koutango	AF013384.1	76	Zika	AF013415.1				

**Anexo 2.**Tabla de secuencias y códigos de acceso GenBank utilizados (Dengue)

DENV-1   Alemania	SECUENCIAS DE DENGUE								
DENV-1   2 Argentina									
DENV-1  DENV-2  DENV-2  DENV-2  DENV-2  DENV-2  DENV-2  DENV-2  DENV-2  DENV-2  DENV-3  DENV-3  DENV-3  DENV-3  DENV-3  DENV-4  DENV-6  DENV-6  DENV-7  DENV-7  DENV-7  DENV-7  DENV-8  DENV-8		1	Alemania	KJ468234.1					
DENV-1  DENV-2  DENV-2  DENV-2  DENV-2  DENV-2  DENV-2  DENV-2  DENV-2  DENV-2  DENV-3  DENV-3  DENV-3  DENV-3  DENV-3  DENV-4  DENV-6  DENV-6  DENV-7  DENV-7  DENV-7  DENV-7  DENV-8  DENV-8		2	Argentina	KC692516.1					
DENV-1    Second									
DENV-1    6   Brunei (Selvático)   KR919820     7   Colombia   KJ189304.1     8   Ecuador   MN556095.1     9   India   MK858126.2     10   Mauritania   MW243063.1     11   México   KY347010.1     12   Nicaragua   MZ008448.1     13   Paraguay   MT040683.1     14   Peerú   MW946253.1     15   Thailandia   MW362477     16   Venezuela   JN819414.1     1   Costa de Marfil   MT982169.1     2   Australia   MN982899.1     3   Brasil   MW577854.1     4   Colombia   FJ024477.1     5   Ecuador   MN462637.1     6   EEUU/Pto. Rico   MZ945535.1     7   Honduras   FJ898449.1     8   India   KJ918750.1     9   Malasia- Selvático   FJ467493     10   México   EF595822.1     11   Nicaragua   MZ008462.1     12   Perú   MW946575.1     3   Thailandia   MZ636804     14   Venezuela   KF955365.1     1   Australia   FJ898442.1     2   Bolivia   DQ867121.1     3   Brasil   GU131954.1     4   Colombia   FJ898457.1     5   CUBA   KJ189296.1     6   Ecuador   Eu482612.1     7   EEUU/PTO RICO   KF955468.1     8   Francia   AY862501.1     9   India   FJ644564.1     10   México   KF973487.1     11   Mozambique   MH888333.1     12   Nicaragua   KT726359.1     13   PARAGUAY   FJ882575.1     14   Perú   JF808129.1     15   Thailandia   JN406515     16   Venezuela   DQ863638.1     1   EEUU/Pto. Rico   GQ252675.1     2   Brasil   KP188561.1     3   Colombia   GQ868584.1     4   Ecuador   KY474335.1     5   Venezuela   JP262781.1     6   India   JQ922560.1     7   Nicaragua   MW881266.1     8   Cambodia   JN638572     9   Selvático   EF457906.1				MW946053.1					
DENV-1    Toolombia   KJ189304.1		5	Brazil	KP188547.1					
DENV-1    Tolombia   KJ189304.1		6	Brunei (Selvático)	KR919820					
DENV-1   9   India		7	Colombia	KJ189304.1					
Partial		8	Ecuador	MN556095.1					
11 México   KY347010.1     12 Nicaragua   MZ008448.1     13 Paraguay   MT040683.1     14 Peerú   MW946253.1     15 Thailandia   MW362477     16 Venezuela   JN819414.1     2 Australia   MN982899.1     3 Brasil   MW577854.1     4 Colombia   FJ024477.1     5 Ecuador   MN462637.1     6 EEUU/Pto. Rico   MZ945535.1     7 Honduras   FJ898449.1     8 India   KJ918750.1     9 Malasia- Selvático   FJ467493     10 México   EF595822.1     11 Nicaragua   MZ008462.1     12 Perú   MW946575.1     13 Thailandia   MZ636804     14 Venezuela   KF955365.1     1 Australia   FJ898442.1     2 Bolivia   DQ867121.1     3 Brasil   GU131954.1     4 Colombia   FJ898457.1     5 CUBA   KJ189296.1     6 Ecuador   EU482612.1     7 EEUU/PTO RICO   KF955468.1     10 México   KF973487.1     11 Mozambique   MH888333.1     12 Nicaragua   KT726359.1     13 PARAGUAY   FJ882575.1     14 Perú   JF808129.1     15 Thailandia   JN406515     16 Venezuela   DQ863638.1     1 EEUU/Pto. Rico   GQ252675.1     1 Perú   JF808129.1     15 Thailandia   JN406515     1 Colombia   GQ868584.1     2 Euador   KY474335.1     5 Venezuela   JP62781.1     6 India   JQ922560.1     7 Nicaragua   MW881266.1     8 Cambodia   JN638572     9 Selvático   EF457906.1	DENV-1	9	India	MK858126.2					
12 Nicaragua   MZ008448.1     13 Paraguay   MT040683.1     14 Peerú   MW946253.1     15 Thailandia   MW362477     16 Venezuela   JN819414.1     2 Australia   MY982899.1     3 Brasil   MW577854.1     4 Colombia   FJ024477.1     5 Ecuador   MN462637.1     6 EEUU/Pto. Rico   MZ945535.1     7 Honduras   FJ898449.1     8 India   KJ918750.1     9 Malasia- Selvático   FJ467493     10 México   EF595822.1     11 Nicaragua   MZ008462.1     12 Perú   MW946575.1     13 Thailandia   MZ636804     14 Venezuela   KF955365.1     1 Australia   FJ898442.1     2 Bolivia   DQ867121.1     3 Brasil   GU131954.1     4 Colombia   FJ89845.1     5 CUBA   KJ189296.1     6 Ecuador   EU482612.1     7 EEUU/PTO RICO   KF955468.1     8 Francia   AY862501.1     10 México   KF973487.1     11 Mozambique   MH888333.1     12 Nicaragua   KT726359.1     13 PARAGUAY   FJ882575.1     14 Perú   JF808129.1     15 Thailandia   JN406515     16 Venezuela   DQ863638.1     1 EEUU/Pto. Rico   GQ252675.1     2 Brasil   GU863638.1     4 Ecuador   KY474335.1     5 Venezuela   JP262781.1     6 India   JQ922560.1     7 Nicaragua   MW881266.1     8 Cambodia   JN638572     9 Selvático   EF457906.1		10	Mauritania	MW243063.1					
13   Paraguay   MT040683.1     14   Peerú   MW946253.1     15   Thailandia   MW362477     16   Venezuela   JN819414.1     2   Australia   MN982899.1     3   Brasil   MW577854.1     4   Colombia   FJ024477.1     5   Ecuador   MN462637.1     6   EEUU/Pto. Rico   MZ945535.1     7   Honduras   FJ898449.1     8   India   KJ918750.1     9   Malasia- Selvático   FJ467493     10   México   EF595822.1     11   Nicaragua   MZ008462.1     12   Perú   MW946575.1     13   Thailandia   MZ636804     14   Venezuela   KF955365.1     1   Australia   FJ898442.1     2   Bolivia   DQ867121.1     3   Brasil   GU131954.1     4   Colombia   FJ898457.1     5   CUBA   KJ189296.1     6   Ecuador   EU482612.1     7   EEUU/PTO RICO   KF955468.1     8   Francia   AY862501.1     9   India   FJ644564.1     10   México   KF973487.1     11   Mozambique   MH888333.1     12   Nicaragua   KT726359.1     13   PARAGUAY   FJ882575.1     14   Perú   JF808129.1     15   Thailandia   JN406515     16   Venezuela   DQ863638.1     4   Ecuudor   KY474335.1     5   Venezuela   JR48561.1     3   Colombia   GQ868584.1     4   Ecuador   KY474335.1     5   Venezuela   JF262781.1     6   India   JQ922560.1     7   Nicaragua   MW881266.1     8   Cambodia   JN638572     9   Selvático   EF457906.1		11	México	KY347010.1					
14   Peerú   MW946253.1     15   Thailandia   MW362477     16   Venezuela   JN819414.1     1   Costa de Marfil   MT982169.1     2   Australia   MN982899.1     3   Brasil   MW577854.1     4   Colombia   FJ024477.1     5   Ecuador   MN462637.1     6   EEUU/Pto. Rico   MZ945535.1     7   Honduras   FJ898449.1     8   India   KJ918750.1     9   Malasia- Selvático   FJ467493     10   México   EF595822.1     11   Nicaragua   MZ008462.1     12   Perú   MW946575.1     3   Thailandia   MZ636804     14   Venezuela   KF955365.1     1   Australia   FJ898442.1     2   Bolivia   DQ867121.1     3   Brasil   GU131954.1     4   Colombia   FJ898457.1     5   CUBA   KJ189296.1     6   Ecuador   EU482612.1     7   EEUU/PTO RICO   KF955468.1     8   Francia   AY862501.1     10   México   KF973487.1     11   Mozambique   MH888333.1     12   Nicaragua   KT726359.1     13   PARAGUAY   FJ882575.1     14   Perú   JF808129.1     15   Thailandia   JN406515     16   Venezuela   DQ863638.1     1   EUU/Pto. Rico   GQ252675.1     2   Brasil   KP188561.1     3   Colombia   GQ868584.1     4   Ecuador   KY474335.1     5   Venezuela   JF262781.1     6   India   JQ922560.1     7   Nicaragua   MW881266.1     8   Cambodia   JN638572     9   Selvático   EF457906.1		12	Nicaragua	MZ008448.1					
15 Thailandia   MW362477   16 Venezuela   JN819414.1   16 Venezuela   JN819414.1   17 Costa de Marfil   MT982169.1   2 Australia   MN982899.1   3 Brasil   MW577854.1   4 Colombia   FJ024477.1   5 Ecuador   MN462637.1   6 EEUU/Pto. Rico   MZ945535.1   7 Honduras   FJ898449.1   8 India   KJ918750.1   9 Malasia- Selvático   FJ467493   10 México   EF595822.1   11 Nicaragua   MZ008462.1   12 Perú   MW946575.1   13 Thailandia   MZ636804   14 Venezuela   KF955365.1   1 Australia   FJ898442.1   2 Bolivia   DQ867121.1   3 Brasil   GU131954.1   4 Colombia   FJ898457.1   5 CUBA   KJ189296.1   6 Ecuador   EU482612.1   7 EEUU/PTO RICO   KF955468.1   10 México   KF973487.1   11 Mozambique   MH888333.1   12 Nicaragua   KT726359.1   13 PARAGUAY   FJ882575.1   14 Perú   JF808129.1   15 Thailandia   JN406515   16 Venezuela   DQ863638.1   EEUU/Pto. Rico   GQ252675.1   2 Brasil   KP188561.1   3 Colombia   GQ868584.1   4 Ecuador   KY474335.1   5 Venezuela   JR988572   9 Selvático   EF457906.1		13	Paraguay	MT040683.1					
16   Venezuela   JN819414.1		14	Peerú	MW946253.1					
DENV-2    Costa de Marfil   MT982169.1		15	Thailandia	MW362477					
DENV-3  DENV-4    2 Australia   MN982899.1		16	Venezuela	JN819414.1					
DENV-2    3   Brasil   MW577854.1     4   Colombia   FJ024477.1     5   Ecuador   MN462637.1     6   EEUU/Pto. Rico   MZ945535.1     7   Honduras   FJ898449.1     8   India   KJ918750.1     9   Malasia- Selvático   FJ467493     10   México   EF595822.1     11   Nicaragua   MZ008462.1     12   Perú   MW946575.1     13   Thailandia   MZ636804     14   Venezuela   KF955365.1     1   Australia   FJ898442.1     2   Bolivia   DQ867121.1     3   Brasil   GU131954.1     4   Colombia   FJ898457.1     5   CUBA   KJ189296.1     6   Ecuador   EU482612.1     7   EEUU/PTO RICO   KF955468.1     10   México   KF973487.1     11   Mozambique   MH888333.1     12   Nicaragua   KT726359.1     13   PARAGUAY   FJ882575.1     14   Perú   JF808129.1     15   Thailandia   JN406515     16   Venezuela   DQ863638.1     1   EEUU/Pto. Rico   GQ252675.1     2   Brasil   KP188561.1     3   Colombia   GQ868584.1     4   Ecuador   KY474335.1     5   Venezuela   JF262781.1     6   India   JQ922560.1     7   Nicaragua   MW881266.1     8   Cambodia   JN638572     9   Selvático   EF457906.1		1	Costa de Marfil	MT982169.1					
DENV-2    A   Colombia   FJ024477.1     5   Ecuador   MN462637.1     6   EEUU/Pto. Rico   MZ945535.1     7   Honduras   FJ898449.1     8   India   KJ918750.1     9   Malasia- Selvático   FJ467493     10   México   EF595822.1     11   Nicaragua   MZ008462.1     12   Perú   MW946575.1     13   Thailandia   MZ636804     14   Venezuela   KF955365.1     1   Australia   FJ898442.1     2   Bolivia   DQ867121.1     3   Brasil   GU131954.1     4   Colombia   FJ898457.1     5   CUBA   KJ189296.1     6   Ecuador   EU482612.1     7   EEUU/PTO RICO   KF955468.1     8   Francia   AY862501.1     9   India   FJ644564.1     10   México   KF973487.1     11   Mozambique   MH888333.1     12   Nicaragua   KT726359.1     13   PARAGUAY   FJ882575.1     14   Perú   JF808129.1     15   Thailandia   JN406515     16   Venezuela   DQ863638.1     2   Brasil   KP188561.1     3   Colombia   GQ868584.1     4   Ecuador   KY474335.1     5   Venezuela   JF262781.1     6   India   JQ922560.1     7   Nicaragua   MW881266.1     8   Cambodia   JN638572     9   Selvático   EF457906.1		2	Australia	MN982899.1					
DENV-2    5   Ecuador   MN462637.1     6   EEUU/Pto. Rico   MZ945535.1     7   Honduras   FJ898449.1     8   India   KJ918750.1     9   Malasia- Selvático   FJ467493     10   México   EF595822.1     11   Nicaragua   MZ008462.1     12   Perú   MW946575.1     13   Thailandia   MZ636804     14   Venezuela   KF955365.1     1   Australia   FJ898442.1     2   Bolivia   DQ867121.1     3   Brasil   GU131954.1     4   Colombia   FJ898457.1     5   CUBA   KJ189296.1     6   Ecuador   EU482612.1     7   EEUU/PTO RICO   KF955468.1     8   Francia   AY862501.1     9   India   FJ644564.1     10   México   KF973487.1     11   Mozambique   MH888333.1     12   Nicaragua   KT726359.1     13   PARAGUAY   FJ882575.1     14   Perú   JF808129.1     15   Thailandia   JN406515     16   Venezuela   DQ863638.1     2   Brasil   KP188561.1     3   Colombia   GQ868584.1     4   Ecuador   KY474335.1     5   Venezuela   JF262781.1     6   India   JQ922560.1     7   Nicaragua   MW881266.1     8   Cambodia   JN638572     9   Selvático   EF457906.1		3	Brasil	MW577854.1					
DENV-2  6 EEUU/Pto. Rico MZ945535.1 7 Honduras FJ898449.1 8 India KJ918750.1 9 Malasia- Selvático FJ467493 10 México EF595822.1 11 Nicaragua MZ008462.1 12 Perú MW946575.1 13 Thailandia MZ636804 14 Venezuela KF955365.1 1 Australia FJ898442.1 2 Bolivia DQ867121.1 3 Brasil GU131954.1 4 Colombia FJ898457.1 5 CUBA KJ189296.1 6 Ecuador EU482612.1 7 EEUU/PTO RICO KF955468.1 8 Francia AY862501.1 10 México KF973487.1 11 Mozambique MH888333.1 12 Nicaragua KT726359.1 13 PARAGUAY FJ882575.1 14 Perú JF808129.1 15 Thailandia JN406515 16 Venezuela DQ863638.1 4 ECUU/Pto. Rico GQ252675.1 2 Brasil KP188561.1 3 Colombia GQ868584.1 4 Ecuador KY474335.1 5 Venezuela JF262781.1 6 India JQ922560.1 7 Nicaragua MW881266.1 8 Cambodia JN638572 9 Selvático EF457906.1		4	Colombia	FJ024477.1					
DENV-2  7 Honduras FJ898449.1 8 India KJ918750.1 9 Malasia- Selvático FJ467493 10 México EF595822.1 11 Nicaragua MZ008462.1 12 Perú MW946575.1 13 Thailandia MZ636804 14 Venezuela KF955365.1 1 Australia FJ898442.1 2 Bolivia DQ867121.1 3 Brasil GU131954.1 4 Colombia FJ898457.1 5 CUBA KJ189296.1 6 Ecuador EU482612.1 7 EEUU/PTO RICO KF955468.1 8 Francia AY862501.1 10 México KF973487.1 11 Mozambique MH888333.1 12 Nicaragua KT726359.1 13 PARAGUAY FJ882575.1 14 Perú JF808129.1 15 Thailandia JN406515 16 Venezuela DQ863638.1 4 ECUU/Pto. Rico GQ252675.1 2 Brasil KP188561.1 3 Colombia GQ868584.1 4 Ecuador KY474335.1 5 Venezuela JF262781.1 6 India JQ922560.1 7 Nicaragua MW881266.1 8 Cambodia JN638572 9 Selvático EF457906.1		5	Ecuador	MN462637.1					
B		6	EEUU/Pto. Rico	MZ945535.1					
Sample   S	DENIZO	7	Honduras	FJ898449.1					
10 México   EF595822.1   11 Nicaragua   MZ008462.1   12 Perú   MW946575.1   13 Thailandia   MZ636804   14 Venezuela   KF955365.1   1 Australia   FJ898442.1   2 Bolivia   DQ867121.1   3 Brasil   GU131954.1   4 Colombia   FJ898457.1   5 CUBA   KJ189296.1   6 Ecuador   EU482612.1   7 EEUU/PTO RICO   KF955468.1   8 Francia   AY862501.1   9 India   FJ644564.1   10 México   KF973487.1   11 Mozambique   MH888333.1   12 Nicaragua   KT726359.1   13 PARAGUAY   FJ882575.1   14 Perú   JF808129.1   15 Thailandia   JN406515   16 Venezuela   DQ863638.1   EEUU/Pto. Rico   GQ252675.1   2 Brasil   KP188561.1   3 Colombia   GQ868584.1   4 Ecuador   KY474335.1   5 Venezuela   JF262781.1   6 India   JQ922560.1   7 Nicaragua   MW881266.1   8 Cambodia   JN638572   9 Selvático   EF457906.1	DENV-2	8	India	KJ918750.1					
11 Nicaragua		9	Malasia- Selvático	FJ467493					
12   Perú   MW946575.1     13   Thailandia   MZ636804     14   Venezuela   KF955365.1     1   Australia   FJ898442.1     2   Bolivia   DQ867121.1     3   Brasil   GU131954.1     4   Colombia   FJ898457.1     5   CUBA   KJ189296.1     6   Ecuador   EU482612.1     7   EEUU/PTO RICO   KF955468.1     9   India   FJ644564.1     10   México   KF973487.1     11   Mozambique   MH888333.1     12   Nicaragua   KT726359.1     13   PARAGUAY   FJ882575.1     14   Perú   JF808129.1     15   Thailandia   JN406515     16   Venezuela   DQ863638.1     2   Brasil   KP188561.1     3   Colombia   GQ868584.1     4   Ecuador   KY474335.1     5   Venezuela   JF262781.1     6   India   JQ922560.1     7   Nicaragua   MW881266.1     8   Cambodia   JN638572     9   Selvático   EF457906.1		10	México	EF595822.1					
12   Perú   MW946575.1     13   Thailandia   MZ636804     14   Venezuela   KF955365.1     1   Australia   FJ898442.1     2   Bolivia   DQ867121.1     3   Brasil   GU131954.1     4   Colombia   FJ898457.1     5   CUBA   KJ189296.1     6   Ecuador   EU482612.1     7   EEUU/PTO RICO   KF955468.1     9   India   FJ644564.1     10   México   KF973487.1     11   Mozambique   MH888333.1     12   Nicaragua   KT726359.1     13   PARAGUAY   FJ882575.1     14   Perú   JF808129.1     15   Thailandia   JN406515     16   Venezuela   DQ863638.1     2   Brasil   KP188561.1     3   Colombia   GQ868584.1     4   Ecuador   KY474335.1     5   Venezuela   JF262781.1     6   India   JQ922560.1     7   Nicaragua   MW881266.1     8   Cambodia   JN638572     9   Selvático   EF457906.1		11	Nicaragua	MZ008462.1					
14 Venezuela   KF955365.1     1 Australia   FJ898442.1     2 Bolivia   DQ867121.1     3 Brasil   GU131954.1     4 Colombia   FJ898457.1     5 CUBA   KJ189296.1     6 Ecuador   EU482612.1     7 EEUU/PTO RICO   KF955468.1     8 Francia   AY862501.1     9 India   FJ644564.1     10 México   KF973487.1     11 Mozambique   MH888333.1     12 Nicaragua   KT726359.1     13 PARAGUAY   FJ882575.1     14 Perú   JF808129.1     15 Thailandia   JN406515     16 Venezuela   DQ863638.1     2 Brasil   KP188561.1     3 Colombia   GQ868584.1     4 Ecuador   KY474335.1     5 Venezuela   JF262781.1     6 India   JQ922560.1     7 Nicaragua   MW881266.1     8 Cambodia   JN638572     9 Selvático   EF457906.1				MW946575.1					
DENV-3  1 Australia FJ898442.1  2 Bolivia DQ867121.1  3 Brasil GU131954.1  4 Colombia FJ898457.1  5 CUBA KJ189296.1  6 Ecuador EU482612.1  7 EEUU/PTO RICO KF955468.1  8 Francia AY862501.1  9 India FJ644564.1  10 México KF973487.1  11 Mozambique MH888333.1  12 Nicaragua KT726359.1  13 PARAGUAY FJ882575.1  14 Perú JF808129.1  15 Thailandia JN406515  16 Venezuela DQ863638.1  1 EEUU/Pto. Rico GQ252675.1  2 Brasil KP188561.1  3 Colombia GQ868584.1  4 Ecuador KY474335.1  5 Venezuela JF262781.1  6 India JQ922560.1  7 Nicaragua MW881266.1  8 Cambodia JN638572  9 Selvático EF457906.1		13	Thailandia	MZ636804					
DENV-3  2 Bolivia DQ867121.1  3 Brasil GU131954.1  4 Colombia FJ898457.1  5 CUBA KJ189296.1  6 Ecuador EU482612.1  7 EEUU/PTO RICO KF955468.1  8 Francia AY862501.1  9 India FJ644564.1  10 México KF973487.1  11 Mozambique MH888333.1  12 Nicaragua KT726359.1  13 PARAGUAY FJ882575.1  14 Perú JF808129.1  15 Thailandia JN406515  16 Venezuela DQ863638.1  1 EEUU/Pto. Rico GQ252675.1  2 Brasil KP188561.1  3 Colombia GQ868584.1  4 Ecuador KY474335.1  5 Venezuela JF262781.1  6 India JQ922560.1  7 Nicaragua MW881266.1  8 Cambodia JN638572  9 Selvático EF457906.1		14	Venezuela	KF955365.1					
DENV-3  3 Brasil GU131954.1  4 Colombia FJ898457.1  5 CUBA KJ189296.1  6 Ecuador EU482612.1  7 EEUU/PTO RICO KF955468.1  8 Francia AY862501.1  9 India FJ644564.1  10 México KF973487.1  11 Mozambique MH888333.1  12 Nicaragua KT726359.1  13 PARAGUAY FJ882575.1  14 Perú JF808129.1  15 Thailandia JN406515  16 Venezuela DQ863638.1  1 EEUU/Pto. Rico GQ252675.1  2 Brasil KP188561.1  3 Colombia GQ868584.1  4 Ecuador KY474335.1  5 Venezuela JF262781.1  6 India JQ922560.1  7 Nicaragua MW881266.1  8 Cambodia JN638572  9 Selvático EF457906.1		1	Australia	FJ898442.1					
DENV-3  4 Colombia FJ898457.1  5 CUBA KJ189296.1  6 Ecuador EU482612.1  7 EEUU/PTO RICO KF955468.1  8 Francia AY862501.1  9 India FJ644564.1  10 México KF973487.1  11 Mozambique MH888333.1  12 Nicaragua KT726359.1  13 PARAGUAY FJ882575.1  14 Perú JF808129.1  15 Thailandia JN406515  16 Venezuela DQ863638.1  Venezuela DQ863638.1  1 EEUU/Pto. Rico GQ252675.1  2 Brasil KP188561.1  3 Colombia GQ868584.1  4 Ecuador KY474335.1  5 Venezuela JF262781.1  6 India JQ922560.1  7 Nicaragua MW881266.1  8 Cambodia JN638572  9 Selvático EF457906.1		2	Bolivia	DQ867121.1					
DENV-3  5 CUBA KJ189296.1  6 Ecuador EU482612.1  7 EEUU/PTO RICO KF955468.1  8 Francia AY862501.1  9 India FJ644564.1  10 México KF973487.1  11 Mozambique MH888333.1  12 Nicaragua KT726359.1  13 PARAGUAY FJ882575.1  14 Perú JF808129.1  15 Thailandia JN406515  16 Venezuela DQ863638.1  Venezuela DQ863638.1  1 EEUU/Pto. Rico GQ252675.1  2 Brasil KP188561.1  3 Colombia GQ868584.1  4 Ecuador KY474335.1  5 Venezuela JF262781.1  6 India JQ922560.1  7 Nicaragua MW881266.1  8 Cambodia JN638572  9 Selvático EF457906.1		3	Brasil	GU131954.1					
DENV-3  6 Ecuador EU482612.1  7 EEUU/PTO RICO KF955468.1  8 Francia AY862501.1  9 India FJ644564.1  10 México KF973487.1  11 Mozambique MH888333.1  12 Nicaragua KT726359.1  13 PARAGUAY FJ882575.1  14 Perú JF808129.1  15 Thailandia JN406515  16 Venezuela DQ863638.1  1 EEUU/Pto. Rico GQ252675.1  2 Brasil KP188561.1  3 Colombia GQ868584.1  4 Ecuador KY474335.1  5 Venezuela JF262781.1  6 India JQ922560.1  7 Nicaragua MW881266.1  8 Cambodia JN638572  9 Selvático EF457906.1		4	Colombia	FJ898457.1					
DENV-3  7 EEUU/PTO RICO KF955468.1  8 Francia AY862501.1  9 India FJ644564.1  10 México KF973487.1  11 Mozambique MH888333.1  12 Nicaragua KT726359.1  13 PARAGUAY FJ882575.1  14 Perú JF808129.1  15 Thailandia JN406515  16 Venezuela DQ863638.1  2 Brasil KP188561.1  3 Colombia GQ868584.1  4 Ecuador KY474335.1  5 Venezuela JF262781.1  6 India JQ922560.1  7 Nicaragua MW881266.1  8 Cambodia JN638572  9 Selvático EF457906.1		5	CUBA	KJ189296.1					
DENV-3  8 Francia AY862501.1  9 India FJ644564.1  10 México KF973487.1  11 Mozambique MH888333.1  12 Nicaragua KT726359.1  13 PARAGUAY FJ882575.1  14 Perú JF808129.1  15 Thailandia JN406515  16 Venezuela DQ863638.1  2 Brasil KP188561.1  3 Colombia GQ868584.1  4 Ecuador KY474335.1  5 Venezuela JF262781.1  6 India JQ922560.1  7 Nicaragua MW881266.1  8 Cambodia JN638572  9 Selvático EF457906.1		6	Ecuador	EU482612.1					
DENV-3  9 India FJ644564.1  10 México KF973487.1  11 Mozambique MH888333.1  12 Nicaragua KT726359.1  13 PARAGUAY FJ882575.1  14 Perú JF808129.1  15 Thailandia JN406515  16 Venezuela DQ863638.1  1 EEUU/Pto. Rico GQ252675.1  2 Brasil KP188561.1  3 Colombia GQ868584.1  4 Ecuador KY474335.1  5 Venezuela JF262781.1  6 India JQ922560.1  7 Nicaragua MW881266.1  8 Cambodia JN638572  9 Selvático EF457906.1		7	EEUU/PTO RICO	KF955468.1					
9 India FJ644564.1 10 México KF973487.1 11 Mozambique MH888333.1 12 Nicaragua KT726359.1 13 PARAGUAY FJ882575.1 14 Perú JF808129.1 15 Thailandia JN406515 16 Venezuela DQ863638.1 2 Brasil KP188561.1 3 Colombia GQ868584.1 4 Ecuador KY474335.1 5 Venezuela JF262781.1 6 India JQ922560.1 7 Nicaragua MW881266.1 8 Cambodia JN638572 9 Selvático EF457906.1	DENIV_3	8	Francia	AY862501.1					
11 Mozambique MH888333.1 12 Nicaragua KT726359.1 13 PARAGUAY FJ882575.1 14 Perú JF808129.1 15 Thailandia JN406515 16 Venezuela DQ863638.1 1 EEUU/Pto. Rico GQ252675.1 2 Brasil KP188561.1 3 Colombia GQ868584.1 4 Ecuador KY474335.1 5 Venezuela JF262781.1 6 India JQ922560.1 7 Nicaragua MW881266.1 8 Cambodia JN638572 9 Selvático EF457906.1	DENV-5			FJ644564.1					
12 Nicaragua KT726359.1 13 PARAGUAY FJ882575.1 14 Perú JF808129.1 15 Thailandia JN406515 16 Venezuela DQ863638.1 1 EEUU/Pto. Rico GQ252675.1 2 Brasil KP188561.1 3 Colombia GQ868584.1 4 Ecuador KY474335.1 5 Venezuela JF262781.1 6 India JQ922560.1 7 Nicaragua MW881266.1 8 Cambodia JN638572 9 Selvático EF457906.1		10	México	KF973487.1					
13 PARAGUAY FJ882575.1 14 Perú JF808129.1 15 Thailandia JN406515 16 Venezuela DQ863638.1 1 EEUU/Pto. Rico GQ252675.1 2 Brasil KP188561.1 3 Colombia GQ868584.1 4 Ecuador KY474335.1 5 Venezuela JF262781.1 6 India JQ922560.1 7 Nicaragua MW881266.1 8 Cambodia JN638572 9 Selvático EF457906.1		11	Mozambique	MH888333.1					
14 Perú JF808129.1 15 Thailandia JN406515 16 Venezuela DQ863638.1  1 EEUU/Pto. Rico GQ252675.1 2 Brasil KP188561.1 3 Colombia GQ868584.1 4 Ecuador KY474335.1 5 Venezuela JF262781.1 6 India JQ922560.1 7 Nicaragua MW881266.1 8 Cambodia JN638572 9 Selvático EF457906.1		12	Nicaragua	KT726359.1					
15 Thailandia JN406515 16 Venezuela DQ863638.1  1 EEUU/Pto. Rico GQ252675.1 2 Brasil KP188561.1 3 Colombia GQ868584.1 4 Ecuador KY474335.1 5 Venezuela JF262781.1 6 India JQ922560.1 7 Nicaragua MW881266.1 8 Cambodia JN638572 9 Selvático EF457906.1				FJ882575.1					
DENV-4  16 Venezuela DQ863638.1  1 EEUU/Pto. Rico GQ252675.1  2 Brasil KP188561.1  3 Colombia GQ868584.1  4 Ecuador KY474335.1  5 Venezuela JF262781.1  6 India JQ922560.1  7 Nicaragua MW881266.1  8 Cambodia JN638572  9 Selvático EF457906.1		14	Perú	JF808129.1					
DENV-4  1 EEUU/Pto. Rico GQ252675.1 2 Brasil KP188561.1 3 Colombia GQ868584.1 4 Ecuador KY474335.1 5 Venezuela JF262781.1 6 India JQ922560.1 7 Nicaragua MW881266.1 8 Cambodia JN638572 9 Selvático EF457906.1		15	Thailandia	,					
DENV-4  2 Brasil KP188561.1  3 Colombia GQ868584.1  4 Ecuador KY474335.1  5 Venezuela JF262781.1  6 India JQ922560.1  7 Nicaragua MW881266.1  8 Cambodia JN638572  9 Selvático EF457906.1		16	Venezuela	-					
DENV-4  DENV-4  3 Colombia GQ868584.1  4 Ecuador KY474335.1  5 Venezuela JF262781.1  6 India JQ922560.1  7 Nicaragua MW881266.1  8 Cambodia JN638572  9 Selvático EF457906.1		1	EEUU/Pto. Rico						
DENV-4  4 Ecuador KY474335.1  5 Venezuela JF262781.1  6 India JQ922560.1  7 Nicaragua MW881266.1  8 Cambodia JN638572  9 Selvático EF457906.1		2	Brasil						
DENV-4 5 Venezuela JF262781.1 6 India JQ922560.1 7 Nicaragua MW881266.1 8 Cambodia JN638572 9 Selvático EF457906.1									
DENV-4 6 India JQ922560.1 7 Nicaragua MW881266.1 8 Cambodia JN638572 9 Selvático EF457906.1									
6 India JQ922560.1 7 Nicaragua MW881266.1 8 Cambodia JN638572 9 Selvático EF457906.1	DENV-4								
8 Cambodia JN638572 9 Selvático EF457906.1									
9 Selvático EF457906.1									
10 Indonesia KU509288.1		10	Indonesia	KU509288.1					