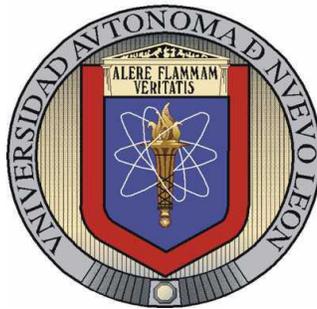


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
LABORATORIO DE ENTOMOLOGÍA MÉDICA**



**POTENCIAL DE TRANSMISION DE DENGUE EN ZONAS NO DOMICILIARES A
TRAVES DE LA BUSQUEDA DE HEMBRAS *Aedes aegypti* INFECTADAS POR VIRUS
DEL DENGUE EN EL AREA METROPOLITANA DE
MONTERREY, NUEVO LEÓN, MÉXICO.**

Por

Q.B.P. EWRY ARVID ZÁRATE NAHÓN

Como requisito parcial para obtener el grado de
DOCTOR EN CIENCIAS con Acentuación en ENTOMOLOGÍA MÉDICA

Agosto, 2012

**POTENCIAL DE TRANSMISION DE DENGUE EN ZONAS NO DOMICILIARES A
TRAVES DE LA BUSQUEDA DE HEMBRAS *Aedes aegypti* INFECTADAS POR VIRUS
DEL DENGUE EN EL AREA METROPOLITANA DE
MONTERREY, NUEVO LEÓN, MÉXICO.**

COMITÉ DE TESIS

Ildefonso Fernández Salas PhD.

Director de tesis

Dra. Ana María Rivas Estilla

Director externo

Dr. Raúl Torres Zapata

Secretario

Dr. Roberto Mercado Hernández

Vocal

Dr. Eduardo A. Rebollar Téllez

Vocal

Dr. Feliciano Segovia Salinas

Vocal

Agosto 2012

DEDICATORIA

A Dios por todas las bondades que me ha dado.

A mi madre: Sra. Martha Elena Nahón Montellano por su gran esfuerzo y sacrificio dedicado a la formación de mi persona como un hombre de bien.

A mi padre: Sr. Margarito Zárate Galis por sus consejos y por todo el apoyo incondicional que me ha brindado.

A mi hermana: Larissa Elena Zárate Nahón por su cariño y ánimo.

A mi Abuelita: Sra Teodosia Montellano Santos por sus consejos, su apoyo pero sobre todo por su cariño y amor.

A mi esposa: Rocío Ramírez Jiménez por todo el apoyo, consejos y amor.

AGRADECIMIENTOS

A Dios:

Por darme el mejor regalo que existe, la vida, por la familia que me dio, por la excelente esposa que tengo, por los buenos amigos y la fortaleza y amor para luchar cada día de mi vida. Gracias por que hemos trabajado juntos para lograr un sueño más. Un doctorado.

A mis padres

Por su amor, consejos, apoyo constante. Gracias.

Rocío Ramírez Jiménez

Por su gran apoyo, por su paciencia y consejos, pero sobre todo gracias por estar siempre a mi lado y mostrarme lo maravilloso de la vida, el amor. Gracias en verdad te lo agradezco.

Dr. Ildefonso Fernández Salas

Gracias por guiarme en mi formación profesional, por compartir el trabajo y los logros del laboratorio, por su apoyo para realizar el presente trabajo, por los consejos, recomendaciones y experiencia científica que me ha servido y servirá en mi vida profesional, pero sobre todo por su amistad y confianza en mí.

Dr. Eduardo Rebollar Téllez

Por sus enseñanzas, apoyo constante, sus consejos y por su puesto por su amistad.

Dra. Ana María Rivas Estilla

Por sus consejos y apoyo en la detección del virus dengue en los mosquitos colectados.

Biol. Jorge J. Rodríguez Rojas, Q.B.P. Esteban E. Díaz Gonzales, Q.B.P. Maricela Laguna Aguilar, Q.B.P. Marcela S. Alvarado Moreno, Q.B.P. Olga Sarai Sánchez Rodríguez, Q.B.P. Rosa María Sánchez Casas,

Gracias por su apoyo para realizar este trabajo, por los consejos y experiencia que me compartieron, en especial gracias por la amistad que logramos, en el tiempo de nuestra formación. Jorge, Esteban gracias por su gran ayuda incondicional en las colectas.

A mis amigos del Laboratorio de Infectología Molecular de la Facultad de Medicina-UANL

M.C. Daniel Arellano, M.C. Elda Melchor, M.C. Adriana Sánchez, M.C.P. Ulises Gloria y al resto del personal, gracias por su ayuda y su amistad.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología

Por el soporte financiero para la realización de la presente investigación.

TABLA DE CONTENIDO

Sección	Página
RESUMEN	x
ABSTRACT	xi
INTRODUCCIÓN	1
HIPÓTESIS	3
OBJETIVOS	4
Objetivo general.....	4
Objetivos particulares.....	4
ANTECEDENTES	5
Los mosquitos. Ubicación taxonómica.....	5
Sitios de cría.....	5
Biología de <i>Ae. aegypti</i> , vector de dengue virus (DENV).....	6
Distribución geográfica.....	7
Ciclo Biológico de <i>Ae. aegypti</i>	8
Huevos.....	9
Larva.....	10
Pupa.....	11
Adulto.....	12
Ciclo gonotrófico.....	15
La historia del dengue y su epidemiología.....	16
Emergencia Mundial.....	17
Seroepidemiología en México.....	22
Dengue: La enfermedad.....	22
Virus del dengue: Clasificación, estructura y propiedades fisicoquímicas.....	25
Genoma viral: organización y estructura.....	26
Replicación y ensamblaje de las partículas virales.....	27
Factores involucrados en las epidemias de dengue.....	30
Mosquitos <i>Ae. aegypti</i> infectados naturalmente. Estudios previos.....	34
MÉTODOS	37
Descripción del área de estudio.....	37
Clima.....	38
Área Metropolitana.....	38
Sitios de colecta.....	38
Búsqueda de criaderos.....	41
Caracterización de los criaderos por tamaño.....	42
Captura de adultos del vector de dengue.....	43
Transporte del material colectado.....	44
Separación e identificación de los mosquitos colectados.....	46
Línea C6/36.....	48
Cultivo de células C6/36.....	49
Virus.....	49
Infección de células C6/36 con DENV.....	49
Detección de DENV en los adultos <i>Ae. aegypti</i> colectados.....	50
Análisis de datos.....	52
RESULTADOS	53
Presencia de criaderos y adultos <i>Ae. aegypti</i> , colectados en sitios no domiciliarios.....	53

Patrones de uso interiores de <i>Ae. aegypti</i> en los sitios no domiciliarios.....	57
Colecta de mosquitos en los sitios no domiciliarios.....	59
Infección por DENV en hembras <i>Ae. aegypti</i>	61
DISCUSIÓN	63
CONCLUSIONES	67
LITERATURA CITADA	69
RESUMEN BIOGRAFICO	79
ANEXOS	80
Cultivo celular - Suplemento de medios de cultivo.....	80
Mantenimiento de líneas celulares.....	82
Recuento celular.....	85
Congelación de líneas celulares.....	88
Descongelación de líneas celulares.....	90
Cultivo viral: amplificación del virus del dengue en líneas celulares.....	92
Cosecha y almacenamiento de aislados virales.....	95
Protocolos para extracción de RNA.....	97
Síntesis de cDNA (retrotranscripción).....	99
Detección molecular del virus del dengue.....	101

INDICE DE FIGURAS

Figura	Contenido	Página
1	Ciclo Biológico de <i>Ae. aegypti</i> . 1. Huevo, 2 Larva, 3 Pupa, 4 Adulto. Línea azul: Fase acuática. Línea roja: Fase terrestre. Tomado de Urdaneta y Failloux, 2011.....	8
2	Huevo de <i>Ae. aegypti</i> , observado al microscopio estereoscópico.....	10
3	Larva de cuarto estadio de <i>Ae. aegypti</i>	11
4	Pupa de <i>Ae. aegypti</i> , observada en el microscopio estereoscópico.....	12
5	Adulto macho y hembra de <i>Ae. aegypti</i>	15
6	Clasificación de casos de dengue sugerida y niveles de gravedad.....	23
7	Genoma viral Dengue. Tomado de Perera y Kuhn, 2008.....	28
8	Ubicación del estado de Nuevo León en el continente Americano.....	37
9	Ubicación del estado de Nuevo León en México.....	37
10	Algunos sitios en donde se realizaron colectas de mosquitos y búsqueda de criaderos potenciales y positivos.....	40
11	Fotos de personal de campo.....	41
12	Criaderos potenciales y criaderos positivos presente en algunos sitios no domiciliarios.....	42
13	Algunos tipos de criaderos encontrados en las colectas realizadas.....	43
14	Hielera donde se muestra el papel mojado, la bolsa plástica y las barras refrigerantes.....	45
15	Cámara húmeda.....	45
16	Método de separación de mosquitos colectados, en plancha fría.....	46
17	Proceso de separación e identificación de mosquitos en frío.....	47
18	Almacenamiento de microtubos.....	47
19	Fotografía de células C6/36 no infectados, creciendo en medio L-15.....	48
20	Maceración de los mosquitos en medio L-15, utilizando un triturador de tejidos.....	51
21	Frecuencias de categorías de criaderos encontrados en los sitios no domiciliarios evaluados en el área metropolitana de Monterrey, N.L. México..	56
22	Patrones de uso de interiores de <i>Ae. aegypti</i> en los sitios no domiciliarios en el área metropolitana de Monterrey, N.L. México.....	58
23	Mosquitos colectados (en reposo) en el ambiente interior de los sitios no domiciliarios estudiados del área metropolitana de Monterrey, N.L. México...	60
24	Mosquitos colectados (en reposo) en el ambiente exterior de los sitios no domiciliarios estudiados del área metropolitana de Monterrey, N.L. México...	60
25	Gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio.....	62
26	Gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio que muestra: uno de la totalidad de los geles en donde no se observó ninguna banda de 510pb.....	62
27	Cámara de Neubauer.....	85
28	Gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio.....	104

INDICE DE TABLAS

Tabla	Contenido	Página
1	Sitios de colecta en el área metropolitana de Monterrey, N.L. México...	39
2	Descripción de las categorías tamaño y forma, de los criaderos, encontrados en sitios no domiciliarios del área metropolitana de Monterrey, N. L. México.....	42
3	Resumen de resultados de la evaluación entomológica realizadas en 141 sitios no domiciliarios del área metropolitana de Monterrey N.L. México.....	55
4	Número de criaderos por categoría observados en las visitas y colectas en sitios no domiciliarios del área metropolitana de Monterrey, N.L. México.....	57
5	Patrones de uso de interiores de <i>Ae. aegypti</i> en los sitios no domiciliarios en el área metropolitana de Monterrey, N.L. México.....	59
6	Mosquitos colectados en sitios no domiciliarios en el área Metropolitana de Monterrey, N.L. México.....	61

RESUMEN

Tradicionalmente se asume que la transmisión del dengue tiene lugar en las casas, siendo el ambiente domiciliar el de más alto riesgo. En México los brotes de dengue continúan año con año, a pesar de los intensos esfuerzos de control. Los sitios no domiciliarios, tales como: escuelas, fábricas, parques públicos, entre otros lugares ya han sido infestados por poblaciones de *Aedes aegypti*. Este estudio tuvo como objetivo evaluar el papel potencial de las poblaciones del vector del dengue que prevalecen en los espacios públicos y privados. Un total de 141 sitios no residenciales fueron evaluados para presencia de los criaderos potenciales y criaderos positivos de mosquitos. El 79.4% del total de sitios evaluados mostró presencia de criaderos potenciales, mientras que en el 91.0% del total se colectó mosquitos adultos. Las escuelas y sitios de recreación tuvieron los promedios más altos de hembras *Ae. aegypti* 21.6 (\pm 30.4) y 10,4 (\pm 6.3). La prueba de chi-cuadrada mostró que no existe diferencia significativa en la presencia del vector de dengue en los sitios no domiciliarios ($\chi^2 = 17.766$, gl = 9, P = 0.38). Los patrones de uso de interior indicaron que los baños y los salones de clases fueron los sitios de descanso preferidos por el vector. La RT-PCR no identificó ácidos nucleicos de DENV a partir de los de 221 pools que contenía 1,521 hembras *Ae. aegypti*. Cualquier lugar donde los seres humanos se reúnan y se muevan va a representar una fuente de sangre para los mosquitos hematófagos. Aún más, el periodo de permanencia de los humanos en los sitios no domiciliarios se sincroniza con el ritmo bimodal de picadura de *Ae. aegypti* aumentando las posibilidades de transferir DENV. Investigación epidemiológica y entomológica se necesita para futuros estudios para evaluar la importancia de otras áreas de riesgo diferentes al domicilio humano.

ABSTRACT

Traditionally dengue transmission has been assumed to take place in the household as the major risk environment. In Mexico dengue outbreaks continue year to year despite intense control efforts. Non-residential sites such as schools, factories, public parks, and others have been infested by populations of *Ae. aegypti* displaced from houses in Monterrey city Northeast Mexico. This study was aimed to assess the potential epidemiological role of the dengue vector densities prevailing in public and private spaces. A total of 141 non-residential sites were evaluated for the presence of breeding sites and adults mosquitoes. Breeding sites were recorded from 79.4% of the sampled sites whereas 94.3% were aspirated with adult individuals. Schools and recreational sites had the higher mean numbers of females *Ae. aegypti* 21.6 (\pm 30.4) and 10.4 (\pm 6.3). Chi-square test showed not significant differences of the dengue vector to select sampled sites categories ($\chi^2 = 17.766$, $df = 9$, $P = 0.38$). Indoor use patterns indicated bathroom and classrooms as the preferred resting sites. RT-PCR essay did not identify DENV nucleic acids from a group of 221 containing 1,521 females *Ae. aegypti*. Wherever humans move and get together they will represent a blood source for hematophagous mosquitoes. Even more, day time human gathering will synchronize to the bimodal biting rhythm of *Ae. aegypti* increasing the chances to transfer DENV. Epidemiological and entomological research is needed in future studies to assess the significance of exposure risk areas others than the human domicile.

INTRODUCCIÓN

Durante las últimas décadas, se han descrito nuevos virus asociados con síndromes severos en los seres humanos y se ha observado un aumento marcado en la incidencia de muchas enfermedades infecciosas ya conocidas en todo el mundo. Las alteraciones ecológicas y las perturbaciones climáticas producidas por el hombre no son los únicos factores que explican la emergencia o re-emergencia de enfermedades, ya que la evolución molecular de los virus, particularmente los virus de RNA, proporcionan una fuente constante de agentes que pueden causar enfermedades nuevas.

El dengue es una virosis transmitida por el mosquito *Aedes aegypti*, y es un problema de importancia mundial en salud pública. Su incidencia ha aumentado con el paso de los años debido a los avances en el transporte y a las bajas condiciones socioeconómicas en las áreas afectadas. Ni el control tradicional, a base de insecticidas contra mosquitos adultos, ni la aplicación de larvicidas a las aguas de los criaderos han dado resultados aceptables. Una de las razones que hace fallar a los programas de control contra el vector, radica en su aplicación, ya que, solo se realizan acciones en el ambiente domiciliar, es decir, casa; ignorando todos aquellos lugares que poseen características que facilitan el establecimiento y reproducción activa de *Ae. aegypti*, dichos lugares incluyen, centros de trabajo, educación, religiosos, parques públicos, hospitales, entre muchos más, en donde, además de tener las condiciones necesarias para la supervivencia del vector, existe un continuo agrupamiento y movimiento de personas

en los picos de mayor actividad de *Ae. aegypti*, es decir, por las mañanas entre las 7:00 y 10:00 horas y por la tarde-noche, entre las 18:00 y 20:00 horas (Chadde, 1988). Se ha registrado en diversos trabajos, la presencia de *Ae. aegypti* en sitios no domiciliarios, así, en Taiwán se encontraron escuelas, oficinas, templos, hospitales, fabricas y lotes baldíos colonizados por *Ae. aegypti* (Hwang y Hsu, 1994), así mismo, en Brasil el uso de ovitrampas demostró que las escuelas (6.8%), deportivos (6.4%) y lotes baldíos (2.8%), son sitios de actividad del vector (da Silva et al., 2006). En Iquitos, Perú, se encontró en un estudio en sitios no domiciliarios, que los mercados públicos presentaron 213.1 pupas/ha y 19.3 adultos/ha (Morrison et al., 2006). En Yucatán, México (García-Rejón, 2011), realizo un estudio en 24 escuelas demostrando la presencia de hembras *Ae. aegypti* alimentadas, además del sitio (cuarto) en donde prefieren descansar, encontrando en 11 de las 24 escuelas hembras del vector infectadas con virus dengue; con estos y mas estudios documentados, es indudable que aún se piense que la transmisión del dengue solo se da en casas y que los sitios no domiciliarios no contribuyen a los brotes de la enfermedad. En México los programas de control del vector del dengue se enfocan en casas, por lo tanto, existe la necesidad de caracterizar los sitios no domiciliarios infestados con *Ae. aegypti*; lo anterior se realizó en el presente trabajo, a través, de la búsqueda de criaderos potenciales (contenedores que puedan almacenar agua), criaderos positivos (con larvas o pupas), colecta de mosquitos adultos, determinación de los sitios de reposo dentro de las construcciones y su relación epidemiológica entre casos de dengue y hembras del vector infectadas con virus dengue, esto, a través de técnicas de biología molecular.

HIPOTESIS

Los datos epidemiológicos de casos de dengue en México en los últimos 12 años indican que cuando se estratifican por intervalos de edad cada 5 años, los picos de mayor frecuencia de casos, aproximadamente 50%, se encuentran entre los 15-45 años de edad. La interpretación epidemiológica indica que estos grupos se encuentran en edad laboral y de actividad escolar. Además, está documentado que la actividad de picadura o alimentación de *Ae. aegypti* es diurna y bimodal, el primer pico entre 9:00-11:00 horas de la mañana y el segundo a las 17:00-19:00 horas de la tarde. El análisis de esta asociación de variables potencializa un segundo ciclo de transmisión de dengue en zonas no domiciliarias. Por lo tanto: la transmisión del virus dengue no solo se realiza en casas, además, existe un segundo ciclo de transmisión en áreas no domiciliarias tales como: escuelas, centros de trabajos, centrales de autobuses, mercados, entre otros.

OBJETIVO GENERAL

Demostrar el potencial de los ambientes no domiciliarios como sitios de actividad de vectores infectados y casos humanos de dengue con la identificación de hembras *Ae. aegypti* infectadas a través de técnicas moleculares, en Monterrey y su área metropolitana, Nuevo León, México.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Demostrar la presencia y abundancia de poblaciones del vector de dengue (*Ae. aegypti*) en zonas no domiciliarias como escuelas, empresas, mercados, hospitales mediante el uso de un aspirador motorizado de espalda.
2. Establecer el cultivo de la línea celular C6/36.
3. Estandarización de las técnicas moleculares e identificar la presencia del virus del dengue en mosquitos hembras colectadas en áreas no domiciliarias.
4. Asociación espacial y temporal de casos humanos de dengue con presencia de vectores infectados en las zonas no domiciliarias, en caso de encontrar mosquitos infectados con dengue.

ANTECEDENTES

Los mosquitos. Ubicación taxonómica

Los mosquitos o culícidos son artrópodos pertenecientes a la Clase Insecta, Orden Díptera y a la Familia Culicidae de gran importancia médico epidemiológica.

Sitios de cría

La presencia de determinadas condiciones en depósitos de agua favorece el desarrollo de determinadas especies de mosquitos. Hay algunas que viven en aguas salobres, otras son de agua dulce y otras se crían en aguas totalmente contaminadas. El estudio de los sitios de cría es importante para poder realizar un efectivo control de los insectos. García (1977) clasificó en cuatro grupos los criaderos de mosquitos, dividiéndolos principalmente por su naturaleza y la permanencia del agua de los mismos, mencionando las especies que crían en cada una de ellas, los grupos son:

- Naturales Permanentes: que incluye lagunas, ciénagas, cuevas de cangrejos, remansos de ríos, etc.
- Naturales Temporarios: que incluye huecos de árboles, piedras y charcos de agua de lluvia, etc.

- Artificiales Permanentes: donde se encuentran las presas, zanjas, cisternas, canales, etc.
- Artificiales Temporarios: como arrozales, latas, llantas, etc.

Biología de *Ae. aegypti*, vector de dengue virus (DENV)

El DENV es transmitido de una persona enferma a una susceptible a través de la picadura de mosquitos hematófagos conocidos como *Ae. aegypti*, principalmente, ya que existen otros vectores selváticos y rurales-semiurbano tal como *Ae. albopictus*. El mosquito *Ae. aegypti* pertenece al Phylum: Artropoda, clase: Insecta, orden: Díptera, suborden: Nematocera, familia: Culicidae, tribu o subfamilia: Culicini, género: Aedes, subgénero: Stegomyia, especie: *aegypti* (Bates, 1970).

La especie *Ae. aegypti* probablemente es originaria de Etiopía, en el continente Africano existen tres formas: una es la forma típica, otra *Ae. aegypti queenslandensis* y *Ae. aegypti formosus*, este último es un mosquito selvático de color más oscuro y talla pequeña. Únicamente las dos primeras formas se encuentran en el continente Americano, muy probablemente fueron introducidas las formas inmaduras en los barriles de agua de los barcos durante las primeras exploraciones y colonizaciones europeas (Nelson 1986; Oldstone, 2002); les tomó décadas adecuarse y dispersarse por el Caribe y establecerse en el continente, lográndolo debido a que el tránsito marítimo se intensificó en esta región desde ese entonces (Gómez-Dantés y Rodríguez, 1994).

Distribución geográfica

Es de dominio universal el conocimiento de que el *Ae. aegypti* tiene una distribución muy amplia y estable entre los trópicos y zonas subtropicales; tiene, además, una preferencia doméstica en su ciclo de vida, por lo que su adaptabilidad es muy grande hacia los diferentes escenarios que el humano hace en sus viviendas; muy difundido en áreas con características urbanas, aunque también se encuentra en áreas rurales. Se distribuye en forma permanente entre los 35° de latitud Norte y 35° de latitud Sur pero puede extenderse hasta los 45° N y hasta los 40° S, donde coinciden con una isoterma de 10 °C en verano, la altitud promedio en donde se encuentra es por debajo de los 1,200 metros, aunque se ha registrado alturas de alrededor de los 2,400 metros sobre el nivel del mar en África.

Sus condiciones mínimas de sobrevivencia y su resistencia a diferentes eventos adversos, como la desecación y la inanición, lo hace un mosquito de presencia muy común y continua, así como de elevadas densidades poblacionales durante las épocas lluviosas con temperatura y humedad estables (SSA, 2009).

Martini (1935) en su estudio de mosquitos de México menciona que los límites de las especies o las superficies de las zonas de distribución no son permanentes, ya que existen movimientos de adelanto o retroceso, causados por las condiciones favorables o desfavorables de temperatura y humedad en diferentes años, y es difícil observar que dirección van a tomar, si se aumenta o se reduce el área, por lo que es necesario tener colectores expertos colectando intensamente y periódicamente.

Vargas (1950) reportaron la distribución geográfica de los mosquitos de México en un estudio hecho para la Universidad de California y las dependencias de cada Estado de México; y reportaron para Nuevo León los siguientes culícidos, entre ellos al vector

del dengue: *Ae. atropalpus*, *Ae. dupreei*, *Ae. epactius*, *Ae. taeniorhynchus*, *Ae. aegypti*, *Cx. coronator*, *Cx. declarator*, *Cx. Interrogator*, *Cx. restauns*, *Cx. tarsalis*, *Cx. thriambus*, *Cx. erraticus*. *Cx. reevesi*, *Cx. inornata*, *Cx. particeps*, *Or. alba*, *Ps. confinis*, *Ps. discolor*, *Ps. signipennis*, *Ps. ciliata* y *Ps. howardii*.

Contreras et al., (1995) en su libro listado preliminar de las especies de fauna del Estado de Nuevo León reportaron los siguientes Culícidos: *Cx. tarsalis*, *Cx. quinquefasciatus*, *Cx. interrogator*, *Cx. coronator*, *Cx. peus*, *Cx. pipiens*, *Cx. salinarius*, *Culiseta* sp., *Ae. atropalpus*, *Ae. aegypti*, *Ae. triseratus*, *Ae. albopictus*, *Ae. dorsalis*, *Ae. nigromaculis*, *Ae. epactius*, *An. pseudopunctipennis*, *An. albimanus*, *An. quadrimaculatus*, *An. franciscanus*, *Ps. hpwardii*, *Ps. signipennis*, *Ps. ciliate*, *Ps. cyanescens*, *Ps. confinnis*, *Ps. columbiae*, *D. cancer* y *Tx. theobaldi*.

Ciclo Biológico de *Ae. aegypti*

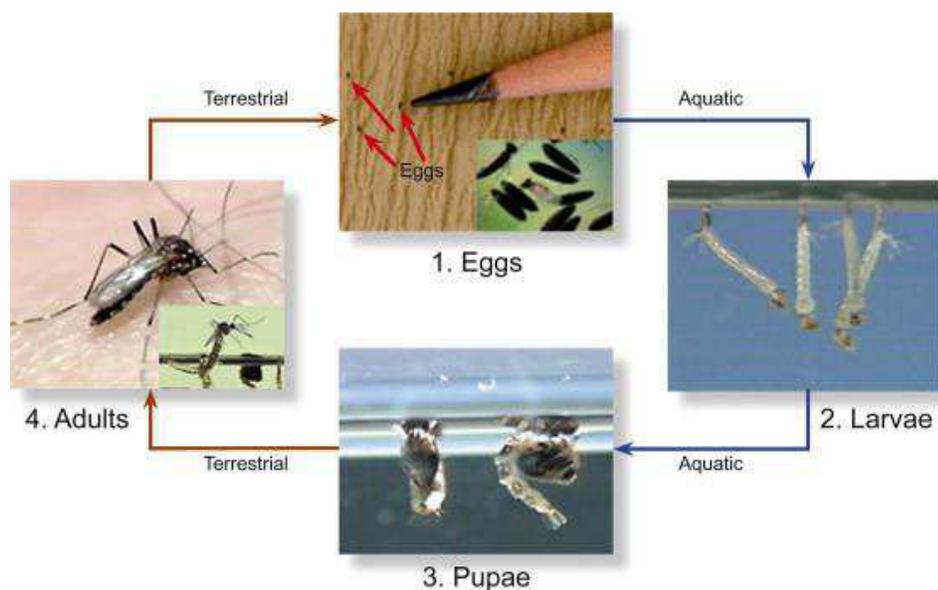


Figura 1. Ciclo Biológico de *Ae. aegypti*. 1. Huevo, 2 Larva, 3 Pupa, 4 Adulto. Línea azul: Fase acuática. Línea roja: Fase terrestre. Tomado de Urdaneta y Failloux, 2011

Huevos

Los huevos del mosquito *Ae. aegypti* en sus formas sinantrópicas, son depositados individualmente en o cerca del nivel del agua, principalmente en tambos y en objetos desechados o guardados por el hombre así como en la forma natural en donde ovoposita en cavidades con agua de lluvia como agujeros de arboles, axilas de las hojas o depresiones en las rocas (Harwood y James, 1987).

Los recipientes de colores oscuros son más atractivos para los mosquitos, especialmente cuando se encuentran en lugares sombreados; y evitan los recipientes contaminados y con olores. La ovoposición la realizan principalmente por las tardes. Si las paredes son muy lisas, los huevecillos se esparcen por la superficie del agua, pero generalmente se quedan pegados a los lados del recipiente, a la altura del nivel del agua (CDC, 1987).

Los huevos de esta especie miden aproximadamente 1mm de largo, son depositados individualmente en las paredes del contenedor. Recién puestos son de color blanco, pero se tornan de color negro brillante en unos minutos (figura 2). El desarrollo embrionario es completado dentro de 48 horas, si el ambiente es húmedo y caliente, sin embargo, puede tomar hasta cinco días a bajas temperaturas, si en este período se quedan sin humedad el embrión muere. Una vez completo el desarrollo embrionario, los huevecillos pueden permanecer largos períodos de desecación, de varios meses hasta un año. Pero en cuanto se sumergen en el agua estos huevos, la acción bacteriana sobre la materia orgánica baja la concentración de oxígeno en el agua, y proporciona el estímulo necesario para la eclosión. Algunos huevos eclosionan a los 15 minutos de la inundación, pero otros eclosionan después de varias inundaciones (CDC, 1987).



Figura 2. Huevo de *Ae. aegypti*, observado al microscopio estereoscópico.

Larva

El período larval en la fase de alimentación y crecimiento. La larva que eclosiona del huevecillo es el primero de 4 estadios larvales. Después de uno o dos días de alimentación, la larva muda su exoesqueleto e inicia el segundo estadio larval. Después de la muda, la capsula cefálica y el sifón son suaves y transparentes, posteriormente se endurecen y se tornan oscuros. En los siguientes estadios, la capsula cefálica y el sifón no cambian de tamaño, pero el tórax y el abdomen crecen considerablemente en las fases subsecuentes. La duración de los estadios larvales depende de la temperatura, disponibilidad del alimento y la densidad larval en el recipiente o criadero. Bajo condiciones óptimas la duración de este período es de 7 a 14 días. Los tres primeros estadios se desarrollan rápidamente, mientras que el cuarto es más largo, ya que se incrementa más en talla y en peso (figura 3). Bajo condiciones adversas, (baja temperatura y carencia de alimento), el cuarto estadio puede durar varias semanas antes de la pupación. La más alta mortalidad ocurre entre el primero y segundo estadio (CDC, 1987).

La larva de *Ae. aegypti* es similar a otras de mosquito, en que presentan cabeza ovoide y nueve segmentos abdominales. Los segmentos posterior y anal del abdomen tienen cuatro branquias lobuladas para la regulación osmótica y un sifón para la respiración en la superficie. El sifón es más corto que en casi todos los otros Culicidae, considerando que en *Anopheles* sp no hay sifón. La posición de descanso en la superficie del agua también es diferente, ya que la larva de *Aedes* sp cuelga verticalmente, en *Anopheles* sp yace paralela a la superficie y en *Culex* sp descansa a un ángulo. La forma de nadar de esta larva se distingue por su movimiento serpentino (CDC, 1987).



Figura 3. Larva de cuarto estadio de *Ae. aegypti*.

Pupa

En este estadio no se alimenta. Su función es la metamorfosis de la fase de larva a adulto (figura 4), se diferencia de la pupa de otros holometábolos en que es extremadamente activa y sensitiva a molestias, moviéndose repentinamente con movimientos circulares hacia aguas más profundas, y cuando se encuentra inactivo flota a la superficie, en la cual se mantiene por flotación. Este estadio dura usualmente de dos a tres días (Harwood y James, 1987).



Figura 4. Pupa de *Ae. aegypti*, observada en el microscopio estereoscópico.

Adulto

Esta es la etapa reproductiva del mosquito, el macho, como en las otras especies de Culicidae, se distingue de la hembra por sus antenas plumosas, y por tener los palpos más largos y desarrollados. Después de la emergencia del estadio pupal, el adulto descansa en las paredes del contenedor por unas cuantas horas, para que su exoesqueleto y sus alas se endurezcan, y en el caso de los machos giran su terminalia 180°. Dentro de 24 horas después de la emergencia, ambos sexos pueden aparearse, y las hembras pueden alimentarse de sangre; estas dos actividades ocurren simultáneamente debido a que son atraídos ambos sexos por el huésped vertebrado, lo que facilita el apareamiento. La cópula se lleva a cabo durante el vuelo, aunque algunas veces se lleva a cabo en superficies verticales u horizontales. Una inseminación es suficiente para fertilizar todos los huevos de la hembra por toda su vida, ya que el esperma se almacena en espermatecas.

La atracción de los machos a las hembras es por el sonido producido por la fricción de las alas al volar, el cual aumenta en frecuencia cuando la hembra se alimenta

de sangre por el aumento de sangre humana, ellas pueden ovopositar poco mas de 100 huevos, y el intervalo de repleción de sangre y la ovoposición es de 2 a 3 días, esta ultima ocurre usualmente en la tarde, y prefieren hacerlo en contenedores oscuros, con agua limpia y clara. En el transcurso de su vida no vuelan más de 50 metros. En laboratorio pueden vivir por varios meses, pero en el ambiente, la mitad de la población muere en la primera semana, y el 95% muere en el primer mes (CDC, 1987).

La descripción del adulto (hembra) es la siguiente: Cabeza: Probóscide con escamas oscuras; palpos cortos y oscuros con escamas plateadas; clípeo con escamas blancas. Tórax: Tegumento del escudo de café oscuro a negro; escudo con reducidas escamas color café-bronce, excepto por un pequeño parche de escamas blanco-plateadas en el margen anterior y un patrón sobresaliente en forma de lira de escamas pálidas (blanco-plateadas) en el dorso; mesepimerón con dos pequeños parches de escamas. Abdomen: 1er terguito con una banda grande de escamas pálidas permaneciendo los terguitos con escamas oscuras, con una pequeña banda blanca basal dorsalmente, parches basales blanco-plateados lateralmente. Ventralmente, los esternitos con escamas blancas, excepto los 2 últimos segmentos con escamas oscuras predominando. Apéndices: fémur oscuro, pálido en la mitad posterior de la parte basal; tibia, con escamas oscuras en su totalidad (figura 5). Tarsomeros de la pata posterior con anillos blancos basales anchos, de los segmentos 1 a 4, segmento 5 blanco. Ala de 2.5 a 3.0 mm, con escamas pequeñas y oscuras (Carpenter y La Casse, 1955).

Las hembras ovopositan en depósitos de agua, que en términos entomológicos son denominados criaderos. Éstos suelen ser desde llantas, floreros, latas, botellas, recipientes plásticos e incluso algunos tan pequeños como tapas de refrescos, en fin, un criadero puede ser cualquier desecho capaz de almacenar agua (Fernández-Salas, 2009).

Una vez que los huevos han embrionado, se tornan resistentes a la desecación, permaneciendo viables en el ambiente hasta por un año, lo cual explica el aumento de la población de mosquitos durante épocas lluviosas, lo que a su vez se asocia con la recrudescencia de la enfermedad (Reiter, 1995).

Uno de los factores más importantes en la mortalidad de las larvas obedece a la presión que su propia población ejerce en los criaderos, debida al consumo de nutrientes cuando la población del criadero es muy alta; por ello, las medidas de control dirigidas al ataque de los adultos, aún cuando sean efectivas eliminando un 90% de la población de larvas en un criadero, no afecta la generación de nuevos mosquitos, pues esa baja en la población es compensada por una mayor sobrevivencia de las larvas restantes (Service, 1992).

Con los sistemas de liberación y recaptura, se ha calculado que la capacidad de vuelo de las hembras es menor de 100 m, lo que concuerda con los estudios de brotes que analizan la distribución de casos. Sin embargo, marcando los huevos con rubidio se ha demostrado que la dispersión usual de los adultos es de hasta 840 m, lo que obliga a re-analizar las campañas en las que se indica la aplicación de rociados con adulticidas en los alrededores de las casas afectadas (Reiter, 1995).

Ae. aegypti, un mosquito cuyos hábitos lo han llevado a un comportamiento antropofílico. Solo la hembra tiene hábitos hematófagos, los que exacerba durante el ciclo gonadotrófico, y esto se asocia con la necesidad de una dieta rica en proteínas para la ovogénesis. Cuando la hembra se alimenta de un enfermo de dengue se infecta; así, a los 8 - 12 días se torna infecciosa, período que se define como "período de incubación extrínseco". Además, se ha documentado transmisión transovárica, lo que significa que las nuevas generaciones permanecerán infectada (Rosen, 1983).

El virus del dengue se replica en las glándulas salivales del mosquito y la infección avanza e involucra el sistema nervioso, afectando su capacidad para alimentarse, ello le obliga a aumentar el tiempo que debe estar succionando sangre, ya que lo hace menos eficientemente; entonces pueden ocurrir interrupciones causadas por el hospedero, que le llevan a alimentaciones interrumpidas en varios hospederos; aumentando así la probabilidad de transmisión de la virosis (Platt, 1997).

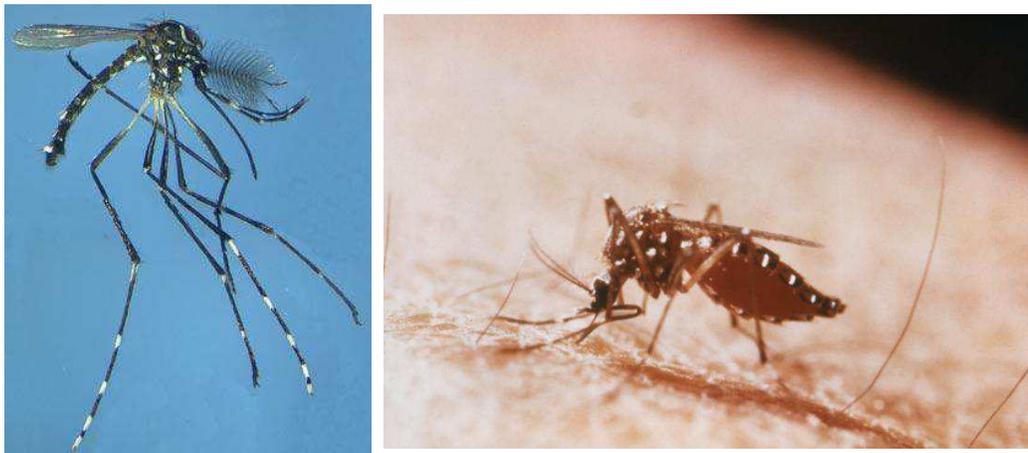


Figura 5. Izq. Adulto macho de *Ae. aegypti*, nótese el patrón de colores y la antena de tipo plumosa. Der. Hembra de *Ae. aegypti* alimentándose, posee el mismo patrón de colores que el macho, sin embargo, posee antena de tipo filiforme, lo cual, la identifica como hembra.

Ciclo gonotrófico

Por lo general, el intervalo de tiempo que transcurre entre la alimentación sanguínea y la postura (ciclo gonotrófico) es de 48 horas en los trópicos bajo condiciones óptimas de temperatura. Llega a ocurrir alimentación de nueva cuenta el mismo día en que se ponen los huevos. La mayoría de las posturas ocurre cerca del crepúsculo. La hembra grávida prefiere los recipientes oscuros o sombreados que contienen agua relativamente limpia, clara y transparente. Los huevos quedan adheridos a las paredes del recipiente en la zona húmeda justamente encima de la superficie del

agua; la hembra suele distribuir los huevos de un mismo ciclo gonotrófico en varios recipientes (Nelson, 1986).

La historia del dengue y su epidemiología

El dengue es una enfermedad infecciosa de origen que provoca una enfermedad con un amplio espectro de formas clínicas que va desde la fiebre indiferenciada hasta las formas más graves con hemorragia y choque (Gubler, 1998).

La primera descripción de una enfermedad compatible con dengue se publicó en la Enciclopedia China en el año 992 de nuestra era. Sin embargo, no fue hasta 1635 que en las Indias Francesas del Oeste se conoció un reporte similar, donde la enfermedad fue denominada “Coup de Barre” (Gubler, 1997). En 1779, en Batavia, Indonesia se reportó una epidemia de casos febriles denominada “Knockelkoorts” (Fiebre de huesos) y en el mismo año en el Cairo, Egipto se le denominó “Mal de Genoux” (problemas de rodilla). En 1780 en Filadelfia, Estados Unidos de América, se reportó la enfermedad febril como “Escarlatina reumática”.

La ocurrencia casi simultánea de epidemias en Asia, África, y América del Norte indicó una distribución mundial de estos virus y su vector. En sus inicios, se consideró una enfermedad benigna de los visitantes a los trópicos (Gubler, 1997). Las epidemias se producían a intervalos de 10-40 años, principalmente porque los virus y su vector transmisor sólo podían transportarse entre los centros de la población a través de la navegación (Gubler, 1997).

Fueron varios los nombres asociados a esta enfermedad de acuerdo a la región geográfica. De esta forma se denominó “La Piadosa” en Cádiz, España (1784-86),

“Dengue” en España (1809), Ki Dinga Pepo, Denga en Zanzibar, África del Este (1823), “Ephemeral fever” en Calcutta, la India (1824), “Dandy fever” Santo Tomas, Islas Virginius (1827), “Dunga, Dengue” en Cuba, 1828, “Polka fever” en Brasil, (1845-49), “Three-day or Seven-day fever” en la India, 1909, “Ban-’Sha” en Taiwan, 1916 y “Five-day fever” en Indonesia (1960s). A partir de la década de los años cincuenta se denominó FD a la forma clásica y FHD/SCD a la forma severa de la enfermedad (Gubler, 1997).

Los estudios de la enfermedad comenzaron con la demostración por Graham (1903) de la capacidad de los mosquitos para transmitir el dengue. El virus dengue se aisló por primera vez en Hawai en 1944, al que se denominó DEN-1 y en el mismo año se aisló en Nueva Guinea otra cepa relacionada antigénicamente a la que se denominó DEN-2 (Sabin, 1950, 1952). En Manila, 1956 y 1960, se aislaron los serotipos 3 y 4 a partir de muestras clínicas de pacientes con un cuadro de dengue hemorrágico (Hammon et al., 1960).

Emergencia Mundial

La pandemia global de dengue que empezó en el Sudeste de Asia después de la Segunda Guerra Mundial, se ha intensificado durante los últimos 30 años, siendo frecuentes las epidemias causadas por varios serotipos (hiperendemicidad) (Gubler, 1998). En el Sudeste Asiático, la FHD en su forma epidémica apareció por primera vez en los años cincuenta (Hammon, 19973; Halstead, 1980), en 1975 ya era una causa importante de hospitalización y muerte, fundamentalmente en niños.

Hasta el año 1990, se habían reportado oficialmente alrededor de 3 millones de casos de FHD, la mayoría de estos en Asia. Tomando en consideración solamente a Tailandia, entre 1958 y 1990 se reportaron 874 207 casos, con una tasa de mortalidad del 1.57 % siendo en este país la quinta causa de morbilidad y la tercera causa de muerte (Gubler, 1997). En Asia, la FHD es considerada una enfermedad de la niñez, observándose dos picos de mayor tasa de incidencia en edades específicas: niños menores de un año de edad y niños entre tres y cinco años. La enfermedad en recién nacidos se asocia a infecciones primarias en presencia de anticuerpos maternos, mientras que la mayoría de los casos observados en niños mayores son el resultado de infecciones secundarias (Gubler, 1998).

En los años ochenta, la FHD comenzó su segunda expansión por Asia cuando Sri Lanka, la India, y las Islas Maldivas tenían sus primeras epidemias de FHD (Gubler, 1998). Las recientes epidemias en Sri Lanka y la India han estado asociadas con múltiples serotipos de los virus del dengue, siendo el DEN-3 predominante y genéticamente distinto de los DEN-3 aislados previamente en esos países (Messer et al., 2002; Messer et al., 2003). En otros países de Asia donde la FHD es endémica, las 11 epidemias han sido progresivamente de mayor extensión en los últimos 15 años (Gubler, 1997; Nuegoonpipat et al., 2004; Klungthong et al., 2004; Thomas et al., 2003).

Los factores responsables de la emergencia de la FHD como una enfermedad epidémica (Gubler, 1998) en Asia en los años cincuenta y del reciente incremento en su incidencia incluyen:

1. Cambios demográficos (crecimiento poblacional y urbanización no planificada) que favorecen el contacto con el vector, el mosquito doméstico *Ae. aegypti*.

2. Cambios ecológicos relacionados a la urbanización (pobre saneamiento ambiental, inadecuado suministro de agua que implica el almacenamiento doméstico de la misma).
3. El rápido incremento de los viajes aéreos, que posibilita el movimiento de personas en fase virémica y la diseminación de múltiples serotipos y cepas del dengue.
4. Establecimiento de una situación de hiperendemicidad y aumento de la frecuencia de infecciones secuenciales en niños.

En el Pacífico, los virus del dengue fueron reintroducidos tempranamente en la década del setenta después de una ausencia de más de 25 años. La actividad epidémica causada por los cuatro serotipos se ha intensificado en los años recientes con epidemias de FHD en varias islas de esa región (Saugrain et al., 1973; Maguire et al., 1974; Barnes y Rosen 1974; Condon et al., 2000; Nuegoonpipat et al., 2004).

La vigilancia del dengue en África ha sido extremadamente pobre, previo a los años 80 la mayoría de los brotes no eran reportados y actualmente aunque la vigilancia no ha mejorado, se ha incrementado el número de reportes. Más recientemente, la mayor actividad epidémica ha ocurrido en África Oriental (Kanesa-Thasan et al., 1994; Rodier et al., 1995).

Los factores descritos previamente como determinantes de la emergencia de la FHD en Asia, algunos años después, también fueron responsables de la emergencia en las Américas. Al final de la década de los años 70 la distribución de *Ae. aegypti* cambió dramáticamente debido al colapso de los esfuerzos para el control del vector. El patrón de 12 las infecciones por dengue en la región latinoamericana cambió de brotes

producidos por un simple serotipo con intervalos inter-epidémicos largos a brotes anuales y co-circulación de tres de los cuatro serotipos del dengue (Gubler, 1997). En 1977, se introdujo el DEN-1 en América provocando epidemias de FD a lo largo de toda la región y aún se encuentra circulando (PAHO, 1979). El DEN-3 por su parte estuvo circulando en la región entre los años 1963 y 1977, sin embargo se reportaban casos esporádicos de FHD.

En la década de los años 80, la FD/FHD se presentó como un problema de salud de gran envergadura. Específicamente en 1981, se reportó en Cuba una epidemia de FHD/SCD sin precedentes en las Américas, causada por una cepa de DEN-2 de origen asiático (Kouri et al., 1987). En este mismo año también se introdujo el DEN-4 en la región. En este período, ambos serotipos causaron epidemias siendo relevantes las epidemias causadas por el DEN-2 en Venezuela y Brasil (Osanai et al., 1983; Hospedales, 1990). Por su parte, el DEN-4, afectó notablemente a Puerto Rico, México, Surinam y El Salvador (Gubler, 1997).

En la década de los años 80 y 90 estuvo circulando en la región de Cuba más de un genotipo de DEN-2, de esta forma otras epidemias fueron causadas por cepas relacionadas genéticamente con la cepa Jamaica/83 también de origen asiático (Rico-Hesse 1990; Leitmeyer et al., 1999). En 1994, tras una ausencia de 17 años, el DEN-3 fue reintroducido en Latinoamérica. Se realizaron aislamientos casi simultáneamente en Nicaragua y Panamá; posteriormente en Costa Rica en el año 1995 (Guzman et al., 1996). Los estudios filogenéticos realizados muestran que el virus aislado tuvo su origen en Asia, relacionándose genéticamente con los virus aislados en la India y Sri Lanka en los años ochenta (Messer et al., 2002; Guzman et al., 1996), y por tanto diferente del que circuló previamente en la Región durante los años 1963-1977. Debido a la

susceptibilidad de la población en los trópicos americanos, esta nueva cepa de DEN-3 se extendió rápidamente a lo largo de la región, causando epidemias de FD/FHD (Rocco et al., 2001). La enfermedad es endémica en las Américas, Sudeste de Asia, Pacífico Oeste, África, Mediterráneo Oriental, con mayor carga en las tres primeras regiones (Rigau-Perez et al., 1998). Aunque los cuatro serotipos del dengue son capaces de producir casos de FHD, el DEN-2 y el DEN-3 son los más frecuentemente asociados con la enfermedad severa. La infección por DEN-1 seguida por DEN-2 ha sido asociada con epidemias de FHD, aunque en áreas hiperendémicas no es fácil definir el virus causante de la infección primaria.

En México el dengue reingresó a finales de los años y se extendió por todo el país. En la actualidad presenta variaciones anuales en su incidencia y brotes epidémicos de diferentes magnitudes, en particular en los estados de la región sur-sureste y costas del Océano Pacífico y Golfo de México, con eventos epidemiológicos más esporádicos en los estados del centro y norte del país (SSA, 2009).

Para el periodo 2001-2007 se observó una tendencia anual ascendente, en la que estados como Veracruz, Chiapas, Quintana Roo, Tamaulipas, Nayarit, Jalisco y Sonora han contribuido a mantener una presencia de casos, cada vez mayor, alcanzando para 2007 las cifras más altas en lo que va de la década, tanto de dengue clásico, como dengue hemorrágico. El comportamiento de la transmisión denota aumentos anuales progresivos, con repuntes en el segundo semestre de cada año. No obstante, en México se observan incrementos en la transmisión al inicio de cada ciclo anual (SSA, 2009).

Seroepidemiología en México

Posterior a la reintroducción del dengue en el territorio nacional, y de acuerdo a la información proporcionada por el Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos, el serotipo 1 fue identificado hasta 1982 en Veracruz, en tanto que el serotipo 2 se identificó en Guerrero en 1983, mismo año en que se logró aislar el serotipo 4 en Oaxaca (SSA, 2009).

Es importante resaltar la circulación en la mayor parte del territorio nacional de los tres serotipos mencionados que concomitantemente con la identificación del serotipo 3 en el año de 1995 aumentan el riesgo de presentación de formas hemorrágicas. En el 2006 se aislaron los cuatro serotipos: DEN-1 (53%), DEN-2 (8%), DEN-3 (27%) y DEN-4 (12%), a la misma fecha se han registrado 1,546 casos de DH, el mayor número de casos se presentó en Veracruz, asociados al serotipo 1, 2 y 3 (SSA, 2009).

Dengue: La enfermedad

Los cambios en la epidemiología del dengue conducen a problemas con el uso de la actual clasificación de la Organización Mundial de la Salud. Las infecciones sintomáticas por el virus del dengue se agruparon en tres categorías: fiebre indiferenciada, fiebre por dengue y fiebre hemorrágica por dengue. Además, esta última se clasificó en cuatro grados, según su gravedad, en donde los grados III y IV corresponden al síndrome de choque por dengue (OMS, 2009). Ha habido muchos informes sobre dificultades en el uso de esta clasificación (Guha-Sapir y Schimmer, 2005; Deen et al., 2006; Rigau-Perez, 2006).

Las dificultades en la aplicación de los criterios clínicos para la fiebre hemorrágica por dengue, junto con el aumento en los casos de dengue clínicamente graves que no cumplen con los estrictos criterios para ese diagnóstico, llevaron a solicitar que se reconsiderara la clasificación. La OMS (2009) ha sugerido una nueva clasificación de los casos de dengue y su nivel de severidad (figura 6). Sin embargo actualmente, la clasificación de fiebre por dengue (dengue clásico), fiebre hemorrágica por dengue (dengue hemorrágico) y síndrome de choque por dengue continúa utilizándose ampliamente (OMS, 2009).



Figura 6. Clasificación de casos de dengue sugerida y niveles de gravedad (OMS, 2009)

Dengue clásico (DC)

Es todo paciente con enfermedad febril aguda caracterizada por dos o más de las manifestaciones siguientes: cefalea generalmente frontal, dolor retroorbitario, mialgias, artralgias, exantema y la presencia simultánea en la zona de otros casos confirmados de Dengue (OMS, 1997).

Dengue Hemorrágico (DH)

Incluye todos los siguientes criterios: fiebre o antecedente de fiebre, presencia de hemorragia evidenciada por la prueba del torniquete positiva, petequias, equimosis, púrpura y/o sangrado de mucosas, del tracto gastrointestinal, sitios de inyecciones u otras, acompañado de trombocitopenia igual o menor a $100,000/\text{mm}^3$, señales de extravasación de plasma y de incremento en la permeabilidad vascular (derrame pleural, ascitis, hipoproteinemia). Así como la presencia de hemoconcentración manifestada por un incremento en el hematocrito mayor de 10% (OMS, 1997).

Esta manifestación más severa es explicada satisfactoriamente por la hipótesis de la Amplificación Dependiente de Anticuerpos (Antibody Dependent Enhancement, ADE) la cual consiste en que los anticuerpos producidos por una infección previa de un serotipo, no son capaces de neutralizar otros serotipos diferentes del virus, lo que produce una replicación viral en masa en el sistema fagocítico mononuclear y una liberación excesiva de citocinas y quimoquinas que inhiben la inmunidad celular innata, aumentan la permeabilidad vascular y la extravasación excesiva de plasma (Halstead, 2008).

Shock por Dengue

Incluye los criterios de la fiebre hemorrágica más la presencia de hipotensión arterial, pulso rápido y débil, extremidades frías. La clasificación de la FHD según su gravedad:

1. Grado I: Fiebre acompañada de síntomas generales no específicos, prueba del torniquete positiva, trombocitopenia y hemoconcentración.
2. Grado II: Las manifestaciones del grado I más la presencia de hemorragia espontánea.
3. Grado III: Insuficiencia circulatoria que se manifiesta por pulso rápido y débil, disminución del intervalo de la presión distólica/sistólica a menos de 20 mmHg, hipotensión, piel húmeda y fría, cianosis e inquietud.
4. Grado IV. Estado de choque profundo con presión sanguínea y pulso imperceptible (OMS, 2009).

Virus del dengue: Clasificación, estructura y propiedades fisicoquímicas

Los virus del dengue pertenecen a la familia Flaviviridae, género Flavivirus el cual agrupa alrededor de 70 miembros. Existen cuatro serotipos (DEN-1, 2, 3, 4), para los cuales se ha descrito una homología de secuencia de un 70% aproximadamente (Arias et al., 1993).

Los viriones maduros son partículas esféricas de 40-60 nm de diámetro, que contienen un núcleo electrodensito de 30 nm de diámetro rodeado por una bicapa lipídica. La envoltura es de 10 nm de espesor y contiene dos proteínas que dan lugar a proyecciones localizadas en la superficie del virión de aproximadamente 7 nm de

longitud (Condit, 2001). Esta bicapa lipídica se deriva de la membrana celular del hospedero. La nucleocápside icosaédrica contiene una molécula de ARN de simple cadena, con orientación positiva, de aproximadamente 11 kpb de longitud y peso molecular de 4.2 kD (Rise, 1990). La constitución lipoproteica de la envoltura de los viriones les confiere una elevada sensibilidad al tratamiento con cloroformo, formaldehído, peróxido de hidrógeno, alcohol y yodo. Además, son sensibles a enzimas hidrolíticas que generan pérdida de ciertas propiedades antigénicas. La infectividad viral se preserva bien a bajas temperaturas y a valores de pH entre 8.4 y 8.8. Son inactivados por la luz ultravioleta, las radiaciones gamma y las altas temperaturas. A 50 °C, se pierde el 50% de la infectividad en 10 min. Se pueden conservar por años a -70 °C y son estables de forma liofilizada a 4 °C (Burke y Monath, 2001).

Genoma viral: organización y estructura

La molécula de ARN (+) se comporta como ARN mensajero durante la síntesis de las proteínas virales. Posee un cap m⁷G5'ppp5'A en el extremo 5'. No presenta cola poliadenilada en el extremo 3'. Presenta un marco de lectura abierto que codifica para una poliproteína precursora que es procesada pre y post-traduccionalmente por proteasas celulares y virales. Los genes ubicados hacia el extremo 5' codifican para las tres proteínas estructurales: la proteína de la cápside (C) y dos proteínas de superficie: la de membrana (M), no glicosilada, la cual se forma durante la maduración a partir del precursor denominado prM y la proteína de envoltura (E), glicosilada. Las proteínas no estructurales son codificadas por genes situados hacia el extremo 3' y se denominan NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B y NS5 (Condit, 2001).

En ambos extremos, 5' y 3' están presentes secuencias no codificantes (NCR) - del inglés non-coding regions. Estas regiones contienen secuencias conservadas, que dirigen el proceso de amplificación, traducción y empaquetamiento del genoma (Condit, 2001). La función más significativa de la NCR 5' probablemente reside en su complementariedad reversa con la NCR 3' de las cadenas negativas virales, la cual forma el sitio de inicio de la síntesis de la cadena positiva. La NCR 3' del genoma de los Flavivirus actúa como promotor de la síntesis de la cadena negativa (Condit, 2001).

Replicación y ensamble de las partículas virales.

Una representación esquemática del genoma viral y la traducción de las proteínas virales están descritas en la figura 7. Una vez que el DENV entra a la célula y se desnuda del genoma viral, durante este proceso, la secuencia señal de la poliproteína dirige su traslocación a través de la membrana del retículo endoplásmico (RE). La poliproteína es procesada post-traduccionalmente por las proteasas virales y celulares en tres proteínas estructurales (C, prM y E) y siete no estructurales (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B y NS5). La proteína E tiene glicosilados los residuos Asn67 y Asn153 para asegurar un adecuado plegamiento de la proteína (Modis et al., 2003; Bryant et al., 2007).

Sobre la traducción a proteínas y el plegado de las proteínas individuales, las proteínas no estructurales (NS) inician la replicación del genoma viral. De estas proteínas, las mejor caracterizadas son la NS3, su cofactor NS2B y la NS5. La NS3 alberga dominios catalíticos, incluyendo serin-proteasas, los cuales requieren el cofactor NS2B (Arias et al., 1993; Falgout et al., 1991). También exhibe función helicasa requeridas para la síntesis del ARN viral (Li et al., 1999), así como de actividad 5'

trifosfatasa, el cual es el primer paso en la metilación de los ARN mensajeros (Bartelma y Padmanabhan, 2002). La proteína NS5 sirve como la ARN polimerasa viral dependiente de ARN, así como metiltransferasa, otra enzima esencial en la metilación del ARN mensajero (Clyde et al., 2006).

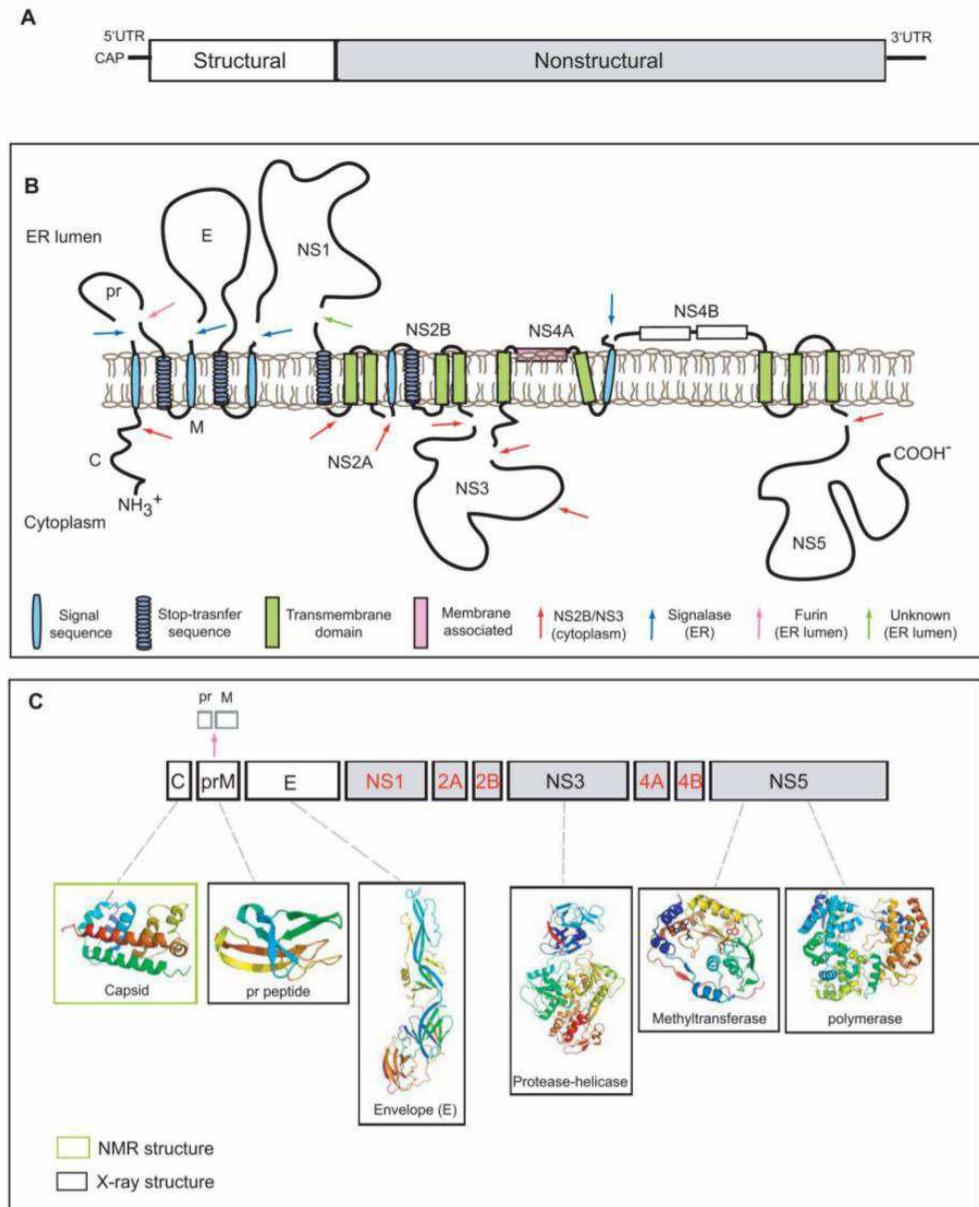


Figura 7. Genoma viral Dengue. Tomado de Perera y Kuhn, 2008

El resto de las proteínas que participan en este proceso, pero que aún no han sido completamente caracterizadas son la NS1, NS2A, NS4A y NS4B. La glicoproteína NS1 se expresa en tres formas: a) la forma residente del RE que se localiza con el complejo de replicación viral, b) la forma anclada a la membrana y c) la forma secretada (sNS1), que puede tener un rol significativo en la patogénesis de la enfermedad. Las proteínas NS2A, NS4A y NS4B, de naturaleza hidrofóbica, se les ha implicado como proteínas que ayudan en la localización apropiada de las proteínas virales y del ARN viral, en la síntesis del ARN y del ensamblaje del virión (Arias et al., 1993).

El nuevo ARN sintetizado es subsecuentemente empaquetado por la proteína C para formar la nucleocápside. Las proteínas prM y E forman heterodímeros que se orientan hacia el lumen del RE. Luego, los heterodímeros prM/E se asocian en trímeros y esas interacciones oligoméricas se cree que inducen un enrejado curvado, el cual guía a la liberación del virión (Kuhn et al., 2002; Zhang et al., 2004). No está claro cómo la nucleocápside se inmersa en este enrejado, ya que aún no se han identificado las interacciones específicas entre la proteínas C y prM/E (Zhang et al., 2003).

Las partículas inmaduras formadas en RE maduran conforme viajan a través de la vía secretora. El pH ligeramente ácido (5.8-6.0) de la Red trans-Golgi dispara la disociación de los heterodímeros prM/E, los cuales dirigen la formación de 90 dímeros que se acuestan sobre la superficie de la partícula. Esta reorganización estructural global de las glicoproteínas permite a las endoproteasas celulares furin romper la prM (Zybert et al., 2008; Yu et al., 2008).

Tanto la proteína prM como el péptido “pr”, se cree que actúan como chaperones que estabilizan la proteína E durante el tránsito a través de la vía secretora, lo que previene cambios conformacionales prematuros de la proteína E la cual dirigirían la

fusión con la membrana. Una vez que se disocia el péptido “pr”, los viriones maduros que se formaron son capaces de infectar nuevas células (Rodenhuis-Zybert et al., 2010).

Factores involucrados en las epidemias de dengue

Factores relacionados al mosquito

Densidad de mosquitos requeridos para la transmisión. La densidad mínima de *Ae. aegypti* que permite la transmisión del virus se ha debatido por mucho tiempo y aún no hay un dato en específico.

Heterogeneidad espacial. Particularmente en Norte y Sur América, las infestaciones de *Ae. aegypti* no están uniformemente presentes a lo largo de las áreas residenciales. Esto explica por qué los brotes epidémicos son dispersos y no uniformes (Favier et al., 2006).

Factores ambientales

Efecto de la temperatura y la precipitación. Los cambios de las poblaciones de *Ae. aegypti* pueden correlacionarse con varios fenómenos climatológicos. La variabilidad diaria, estacional e interanual en la temperatura, humedad atmosférica y la precipitación pueden influenciar las poblaciones de mosquitos y la competencia vectorial en una variedad de maneras. La transmisión del dengue es casi siempre estacional; los casos se incrementan durante la estación cálida y lluviosa (Halstead, 2008).

Temperaturas cálidas y alta humedad contribuyen a un incremento en la sobrevivencia de adultos. Además, acortan el ciclo gonotrófico y el periodo extrínseco de incubación (Yasuno y Tonn, 1970).

Precipitación. Hay dos ejemplos que ilustran roles contradictorios de precipitación sobre las poblaciones de *Ae. aegypti*. En un estudio de 1966 a 1968 en un templo budista en Tailandia, se encontró la presencia constante de criaderos de *Ae. aegypti* debido a que los criaderos eran manualmente llenados y no tenían influencia de la precipitación (Pant y Yasuno, 1973). En contraste, en un estudio conducido en Bangkok en 1962, se observó que la población de hembras *Ae. aegypti* se hizo presente con el comienzo de la estación lluviosa y anticiparon la curva de hospitalización del dengue hemorrágico por dos meses (Halstead, 2008).

Variación climática global y el calentamiento global. Los datos que apoyan que una influencia en variaciones climáticas interanuales, como El Niño, y del calentamiento global en la transmisión del dengue no son convincentes. La transmisión del dengue está muy relacionada con la pobreza urbana, la falta de agua entubada universal y de aire acondicionado (Halstead, 2008).

Factores relacionados al humano

El número básico de reproducción, R_0 , es el número de infecciones secundarias que resultan de un único humano infectado. A mayor número básico de reproducción, mayor es la explosión de la transmisión. Las enfermedades con altos números están caracterizadas con umbrales bajos de inmunidad de grupo (Fine, 1993). Los números básicos de reproducción estimados para dengue están en el rango de 1.33 y 11.6. Las grandes variaciones en este valor se deben a que muchas de estas mediciones sufren de

limitaciones en los datos o metodologías epidemiológicas, entomológicas o serológicas (Halstead, 2008).

Título de la viremia. Un punto crucial para la transmisión exitosa es la cantidad de virus en la sangre. Sin embargo, el umbral virémico necesario para la transmisión del virus dengue es desconocido. La duración de la viremia puede estar en función de la dosis viral administrada por los mosquitos infectados (Halstead, 2007).

Transmisión doméstica. Una vez que un mosquito infectivo entra a una casa o el miembro de una hogar resulta infectado, la probabilidad de múltiples infecciones en los hogares se incrementa y puede resultar en infecciones de dengue agrupadas (Neff et al., 1967).

Dispersión del virus. La dispersión del virus dengue es principalmente por acción humana. Los humanos virémicos son las fuentes más probables de importación del virus a lo largo del mundo. Se ha demostrado en países endémicos, ondas progresivas de casos con una periodicidad de hasta tres años entre grandes brotes, así como un patrón de predominancia sucesiva de diferentes serotipos (Cummings et al., 2004).

Reinfección. La observación epidemiológica más fundamental relacionada al dengue hemorrágico y al síndrome de choque por dengue es que ocurren regularmente en localidades donde dos o más serotipos del dengue están simultáneamente, o en epidemias secuenciales. En estas localidades, el dengue hemorrágico y el síndrome de choque por dengue ocurren en dos grupos inmunológicos: a) en individuos de un año o más quienes han sido infectados con dos o más serotipos de dengue diferentes en intervalos de al menos un año hasta 20 años, y b) en áreas hiperendémicas, con individuos menores de un año quienes adquirieron anticuerpos pasivamente (leche materna de madres que ya habían sido infectadas) y quienes son infectados con el virus del dengue

por primera vez, siempre y cuando los serotipos que hayan infectado, tanto a la madre como al bebé, hayan sido diferentes (Halstead, 2008). Las segundas infecciones con dengue se han asociado con grandes brotes de dengue hemorrágico (Kouri et al., 1986).

Edad. Se ha observado que los niños más jóvenes son más susceptibles que los niños más grandes y adultos a la permeabilidad vascular durante una segunda infección de dengue (Guzmán et al., 2002).

Inmunidad de grupo. Es el máximo nivel de inmunidad en el cual la transmisión es eliminada en una población determinada. Permite conocer el nivel deseado de inmunización (mediante la vacunación) de una población ante un agente infeccioso (Halstead, 2008).

Factores relacionados al virus

Diferentes cepas del mismo serotipo del virus parecen variar en su capacidad de causar una enfermedad manifiesta o infecciones aparentes. Las infecciones primarias con el virus DENV-2 genotipo Nueva Guinea C y con el virus DENV-2 genotipo cosmopolita produjeron solamente FD, y en contraste, la infección primaria con el virus DENV-2 genotipo III no causó una enfermedad (Guzmán et al., 1990). Sin embargo, la infección secundaria con el virus DENV-2 genotipo Americano causó una epidemia con casos severos de FHD (Watts et al., 1999).

Si los factores virológicos están involucrados, es muy probable que residan en las características antigénicas en común entre los virus de la primera y segunda infección. Un excelente ejemplo es la neutralización del virus DENV-2 genotipo Americano por anticuerpos para DENV-1. Estos resultados sugieren que la baja virulencia del DENV-2 genotipo Americano resultó de una similitud en los epítopes superficiales de DENV-1,

que permitió la neutralización parcial por los anticuerpos anti-DENV-1 (Kochel et al., 2002).

Mosquitos *Ae. aegypti* infectados naturalmente

Estudios previos

El primer estudio en detectar el DENV en mosquitos *Ae. aegypti* colectados en campo, se realizó por Hammon et al. (1960) en Filipinas y Taiwán. Los estudios posteriores, fueron realizados principalmente en diferentes países de Asia y América.

Uno de los primeros estudios en América del Sur fue realizado en Colombia por Romero et al., (1998) donde se colectó 2,065 hembras durante seis meses, de las cuales tres fueron positivas para DENV-1 y 21 para DENV-2. La tasa mínima de infección contando ambos serotipos fue de 1.1%. Estos resultados fueron consistentes a los serotipos detectados en pacientes que habían padecido dengue en la región de estudio.

En un estudio prospectivo de campo conducido de Julio del 2000 a Julio del 2001 por Lourenço et al. (2002) en Río de Janeiro, Brasil, en donde se colectó 352 hembras y se agruparon en lotes (también llamados pools), cada uno de entre 9-17 mosquitos. Tres lotes fueron positivos únicamente para DENV-3, a pesar de la co-circulación de DENV-1, DENV-2 y DENV-3 en el área.

En un estudio que fue realizado en el estado de Amazonas, Brasil, Pinheiro et al. (2005) se logró colectar 674 mosquitos hembra durante los meses de Febrero a Junio del 2003, los cuales se agruparon en 82 lotes. Catorce lotes fueron positivos para DENV-3 (17.1%) y la tasa de infección mínima del 2.1%.

Méndez et al. (2006) condujeron un estudio en un área endémica de dengue en Colombia para evaluar la dinámica de transmisión del DENV durante y después de las epidemias. Los índices del único indicador entomológico relacionado a las infecciones de dengue en humanos fueron las tasas de infección en lote de los mosquitos. Las tasas de infección mostraron diferencias significativas entre la epidemia (10.68, 95% intervalo de confianza, [CI]=7.04-15.92) y después del periodo de epidemia (6.15, 95% IC, [CI]=3.46-10.19). El incremento en las tasas de infección en el mosquito fue asociado con el incremento en las tasas de infección en humanos en el siguiente trimestre del estudio.

Costa et al. (2009) colectaron 414 mosquitos hembra en 46 distritos de la ciudad de Manaus, Brasil, entre Diciembre del 2005 y Diciembre del 2006. Los mosquitos fueron agrupados en lotes de 1-10 especímenes, con un total de 138 lotes, de los cuales 111 fueron positivos a DENV-3 y un solo lote fue positivo para DENV-1 y DENV-3. La prevalencia de mosquitos infectados con DENV-3 fue del 53%.

Vilela et al. (2010) colectaron 137 hembras durante el periodo de 2005-2006 en la ciudad de Belo Horizonte, Brasil, y se agruparon en 15 lotes. Resultaron positivos tres lotes para DENV-3.

El primer estudio de este tipo realizado en México fue hecho por García-Rejón et al. (2008) en la península de Yucatán, México, en la que se procesaron 336 lotes de hembras (total de 1,938), colectadas en las viviendas de pacientes que habían mostrado síntomas dentro de un rango de 1-4 semanas, resultando positivos 34 lotes (10.1%) para DENV por RT-PCR, predominando el serotipo DENV-1, sobre DENV-2 y DENV-3. La tasa mínima de infección fue de 1.8%.

Mora-Covarrubias et al. (2010) publicaron la presencia de mosquitos hembra infectados con Dengue en Ciudad Juárez, Chihuahua, México. Donde se capturo 122 mosquitos y se agruparon en 42 lotes, de los cuales siete fueron positivos para DEN-2, diez para DEN-3 y siete para ambos serotipos.

En otro estudio de García-Rejón et al. (2011), se demostró la presencia de hembras infectadas en escuelas públicas de Mérida, Yucatán, México. Se examinaron 118 lotes de hembras (de un total de 415) y se detectaron 19 lotes positivos (16.1%). Los lotes infectados con DENV fueron detectados en 11 (45.8%) de 24 escuelas monitoreadas. La tasa de infección de Dengue fue de 4.8 por 100 mosquitos.

Recientemente en Estados Unidos, Graham et al. (2011) demostraron la transmisión local del virus del Dengue en Key West, Florida, en la que detectaron DENV-1 en dos lotes de un total de 1,178 lotes analizados. La transmisión local en los Estados Unidos de América, exceptuando los casos esporádicos en la frontera México – Estados Unidos de América, no ocurría desde 1946, lo cual sugiere que es una enfermedad re-emergente en este país.

MATERIAL Y METODO

Descripción del área de estudio

Nuevo León

Las coordenadas geográficas al Norte $27^{\circ}49'$, al Sur $23^{\circ}11'$ de latitud Norte; al Este $98^{\circ}26'$, al Oeste $101^{\circ}14'$ de longitud Oeste. El estado de Nuevo León representa el 3.3% de la superficie del país (figura 8 y 9) (INEGI Marco Geoestadístico). Nuevo León colinda al norte con Coahuila de Zaragoza, Estados Unidos de América y Tamaulipas; al este con Tamaulipas; al sur con Tamaulipas y San Luis Potosí; al oeste con San Luis Potosí, Zacatecas y Coahuila de Zaragoza (figura 9).



Figura 8. Ubicación del estado de Nuevo León en el continente Americano



Figura 9. Ubicación del estado de Nuevo León en México

Con base en los resultados del Censo General de Población y Vivienda del 2010, el estado de Nuevo León tiene una población de 4,150,000 habitantes distribuidos en 51 municipios; el 29.98% de ellos se encuentra en el municipio de Monterrey (INEGI 2011).

Clima

En Nuevo León predominan los climas semisecos extremosos. La precipitación pluvial es en general bastante escasa, aunque cuenta con regiones que registran lluvias anuales mayores de 800mm. La media general anual del estado oscila entre 300 y 600mm. Los climas seco y semiseco se distribuyen principalmente en la región nororiental, la cual forma parte de la Gran Llanura de Norteamérica; y en la región suroccidental, separada de la primera por las alturas de la Sierra Madre Oriental.

En áreas menores de la región de la sierra, en la zona del centro y sur de la entidad y en gran parte de la cuenca del Río San Juan se registran los climas semicálidos, templados y semifríos (INEGI, Carta de Climas 2011).

Área Metropolitana

El área metropolitana de Monterrey está formada por: Monterrey, Apodaca, Escobedo, Guadalupe, Santa Catarina, San Nicolás de los Garza y San Pedro Garza García.

Sitios de colecta

El presente estudio se realizó en el área metropolitana de Monterrey, exceptuando Santa Catarina. Para cumplir con los objetivos de la investigación, fueron elegidos al azar 141 sitios no domiciliarios (tabla 1) los cuales fueron muestreados entre Agosto 2009 y Noviembre 2010, definiendo que un sitio no domiciliar (non-residential sites, en inglés) es todo aquel sitio que no sea una casa, es decir un domicilio y que en él exista una estancia temporal y un movimiento continuo de personas, estos sitios

incluyen: centro educativos, centros laborales, sitios recreativos, centros religiosos, mercados, puertos, centrales camioneras, entre otros sitios (figura 10).

Cada uno de los 141 sitios no domiciliarios fue informados con anterioridad (antes de realizar la colecta) sobre su participación en el estudio, para ello se les explicaba de manera verbal y escrita, los objetivos del estudio, como se realizaría la inspección y colecta, además de informarle que sus datos permanecerían en el anonimato (por lo cual en el escrito no se manejan nombres de las escuelas empresas, etc. así mismo, no se muestra las direcciones, sin embargo esos datos existen en las hojas de datos de campo). Una vez que aceptaban la participación en el estudio se programaba una visita para realizar la colecta, las cuales siempre fueron entre las 7:30 y las 11:30 horas y las 17:30 y 20:00 horas, lo anterior con el objetivo de coincidir con el horario de mayor actividad de *Ae. aegypti*. Las colectas preferentemente se programaban entre semana, ya que es cuando hay mayor actividad humana en los sitios no domiciliarios, exceptuando las iglesias y algunos centros de trabajo en cuyo caso los fines de semana son los más activos.

Tabla 1. Sitios de colecta en el área metropolitana de Monterrey, N.L. México.

Sitio no domiciliar	Cantidad
Escuelas	33
Iglesias	25
Vulcanizadoras	10
Fabricas	10
Negocios	23
Centrales de autobuses	3
Yonkes	12
Bibliotecas	7
Centros recreativos	8
Oficinas de gobierno	10
Total	141

Las colectas se realizaron en equipos de dos a tres personas, preferentemente hombres y mujeres, los cuales portaban uniforme de campo (pantalones de mezclilla, camisa manga larga, chaleco, gorra o sombrero y zapatos de campo, tipo bota) e identificación (figura 11), colocada en un lugar visible, el personal contaba con lo siguiente: vehículo, tabla con clip, hojas de datos de campo, lápiz, bolígrafo tinta azul, cinta adhesiva (tape), marcador permanente tinta negra punta fina y extra fina, sistema de posicionamiento global (GPS), hielera con cámara húmeda, linterna, pipetas tipo gotero, bolsas de transporte para larvas, aspirador bucal, mochila aspiradora motorizada (backpack) y suficientes contenedores para motomochila (por lo menos 20).



Figura 10. Fotos de algunos sitios en donde se realizaron colectas de mosquitos y búsqueda de criaderos potenciales y positivos. De izquierda a derecha: yonke, patio de jardín de niños, salón de clases de primaria, salón de catecismo en iglesia, platicas religiosas en patio de una parroquia y patios de cuartel de policía. Fotos por Rocío Ramírez Jiménez.



Figura 11. Fotos de personal de campo. Izquierda: vehículo oficial debidamente identificado y personal portando uniforme, identificación y aspiradora. Derecha: colectando mosquitos adultos con el aspirador de espalda motorizado. Fotos por Ewry A. Zárate Nahón.

Búsqueda de criaderos

En cada sitio no domiciliar visitado se procedió a buscar criaderos potenciales y criaderos positivos, definiendo, que un criadero potencial es: todo aquel recipiente que por su forma y ubicación pueda contener agua y servir como un sitio de ovoposición para las hembras de *Ae. aegypti*; mientras que un criadero positivo es todo aquel recipiente con agua que contenga por lo menos dos o más estadios inmaduros de *Ae. aegypti*, es decir larvas o pupas. La búsqueda de criaderos se realizó dentro de las construcciones y en la periferia de las mismas (figura 12). El número, tipo y tamaño de los criaderos fue capturado en las hojas de registro de campo.



Figura 12. Criaderos potenciales y criaderos positivos presente en algunos sitios no domiciliarios. De izquierda a derecha: patio de un depósito de autopartes (yonke), patio de una vulcanizadora. Fotos por Ewry A. Zárate Nahón.

Caracterización de los criaderos por tamaño

Los criaderos fueron categorizados por su tamaño y forma (figura 13), con el objeto de identificar los criaderos más frecuentes y con esa información adecuar las medidas de control del vector (tabla 2).

Tabla 2. Descripción de las categorías tamaño y forma, de los criaderos, encontrados en sitios no domiciliarios del área metropolitana de Monterrey, Nuevo León, México.

Categoría	Descripción
Pequeño	Floreros, latas (pintura, atún, leche evaporada, bebidas, entre otras), macetas, ollas, platos, vasos, tazones, botes (de refresco, agua y bebidas alcohólicas), platos para mascotas y naturales (huecos en piedras, huecos en arboles, hojas, cascaras de frutas y axilas de plantas).
Mediano	Llantas, tinas, cubos, tanques de baño, lavabos, hieleras, muebles pequeños o partes y autopartes.
Grande	Tanques de almacenamiento, albercas, tambos ($\geq 200L$) y pozos.
Atípico	Depresiones en el piso, huecos, charcos, bolsas plásticas o lonas, entre otros que no son fáciles de clasificar.

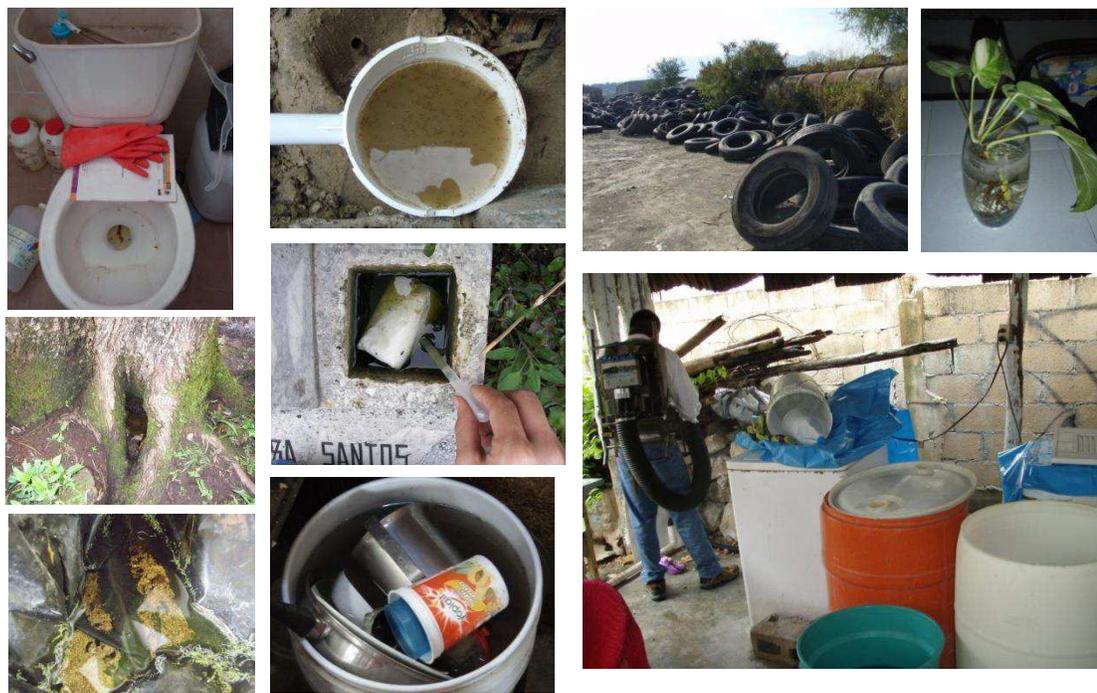


Figura 13. Algunos tipos de criaderos encontrados en las colectas realizadas. De izquierda a derecha, mueble de baño (criadero mediano), calado tomado de una llanta con agua (criadero mediano), llantas, florero (criadero pequeño), hueco de árbol (criadero pequeño), florero exterior (criadero pequeño), tambos de 200L (criadero grande), bolsa plástica con agua y larvas encontrado en el patio de una escuela (criadero atípico), utensilios de cocina (criadero pequeño). Fotos por Ewry A. Zárate Nahón.

Captura de adultos del vector de dengue

Se utilizó un aspirador motorizado de espalda (CDC Backpack Aspirator Model 1412) para capturar los mosquitos adultos, (Clark 1994). En cada sitio de colecta se procedió a hacer una búsqueda activa de mosquitos adultos, es decir, se realizó la búsqueda del vector en todos los sitios, incluyendo lugares oscuros, húmedos, como baños, debajo y detrás de muebles, entre otros lugares, lo anterior se realizó dentro y en la periferia (patio) de los sitios no domiciliarios estudiados. La duración de las colectas

dependió, del número de integrantes del equipo colector, así mismo, como el tamaño y tipo de sitio (escuela, iglesia, fábrica, etc.), en promedio la colecta se realizaba entre 40 y 60 minutos.

Las colectas se realizaban por cuarto (oficinas, baños, salones, biblioteca, cafetería, talleres, almacén, auditorio, otros), de tal manera, por cada cuarto se usaba un (o más) colectores y los mosquitos capturados se contaron y procesaron como mosquitos del cuarto “x”, así se realizó para cada cuarto y para cada sitio no domiciliar.

Todos los datos sobre tipo de criaderos, presencia de mosquitos, coordenadas, entre otros, fueron capturados en las hojas de datos de campo, usando tinta azul.

Transporte del material colectado

Los mosquitos, larvas y pupas colectados, se transportaron al Laboratorio de Entomología Médica de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UANL. Las larvas de cuarto instar fueron identificadas mediante claves (Darsi y Ward, 2005) taxonómicas. Ya que los mosquitos fueron procesados por técnicas moleculares en búsqueda de ARN del virus dengue, fue de suma importancia que los mosquitos llegaran vivos al laboratorio, con el fin de minimizar el daño al ARN.

Los mosquitos adultos fueron transportados en los contenedores utilizados en la aspiradora motorizada de espalda, los cuales se colocaron en cámara húmeda, las cuales, se realizan colocando una capa de papel (periódico o similar) mojado con agua en el fondo de una hielera, cubriendo dicha capa con plástico (regularmente se usan bolsas de supermercado), sobre ella se colocan los contenedores (figura 14). Se debe de tener cuidado de no dejar la hielera destapada o en lugares calientes. Si la temperatura

ambiente está por arriba de los 38°C es necesario colocar barras de refrigerante dentro de la hielera (figura 15).



Figura 14. Hielera donde se muestra el papel mojado, la bolsa plástica y las barras refrigerantes. Fotos por Ewry A. Zárate Nahón.



Figura 15. Cámara húmeda, las barras refrigerantes pueden ir sobre el plástico o debajo, y solo se utilizan cuando la temperatura ambiente está por arriba de los 38°C. Fotos por Ewry A. Zárate Nahón.

Una vez que se llegó al laboratorio los contenedores con mosquitos se colocaron en el congelador del refrigerador (-10°C) por espacio de 10 minutos para sacrificarlos. Lo ideal es sacrificar y procesar (separar, identificar, hacer pools y almacenar a -70/-80°C) los contenedores de uno por uno. Esto para reducir al mínimo el daño al material genético. Sin embargo, esto no siempre es posible por lo cual se aconseja que los contenedores no permanezcan por más de 4 a 8 horas a -10°C, si no se pueden procesar en ese tiempo se deben almacenar a -70°C (preferentemente a -80°C). Mientras los

mosquitos están en el congelador se enciende la plancha fría (chill table), para esto se enciende primero el condensador y posteriormente la plancha.

Separación e identificación de los mosquitos colectados

Ya que los mosquitos están muertos se procedió a la separación por especie y sexo. Esto se realiza sobre una plancha fría, (durante la separación la plancha debe estar por lo menos a -2°C , de no ser así, no iniciar la separación), los mosquitos se colocaron en placas Petri (figura 16) las cuales contenían en el fondo un círculo de papel filtro u otro material de color blanco (evitar mojar el papel, ya que con el frío de la plancha las patas y alas de los mosquitos se congelan y se adhieren al papel dañando el material biológico). En seguida se procedió a la identificación taxonómica (Darsi y Ward, 2005) y separación, utilizando pinzas y agujas entomológicas (figura 17). Se evitó corrientes de aire y fuentes de calor cercanas tales como focos, hornos, autoclaves, etc.



Figura 16. Método de separación de mosquitos colectados, en plancha fría utilizando cajas Petri. Foto por Ewry A. Zárate Nahón

Es preferible utilizar lupas para la identificación, ya que la luz de los estereoscopios es muy caliente y provoca un daño irreparable al ARN. Una vez identificados y separados por sexo los mosquitos, se realizaron los pools, los cuales tuvieron un máximo de 20 mosquitos (del mismo sexo, especie y lugar de colecta).

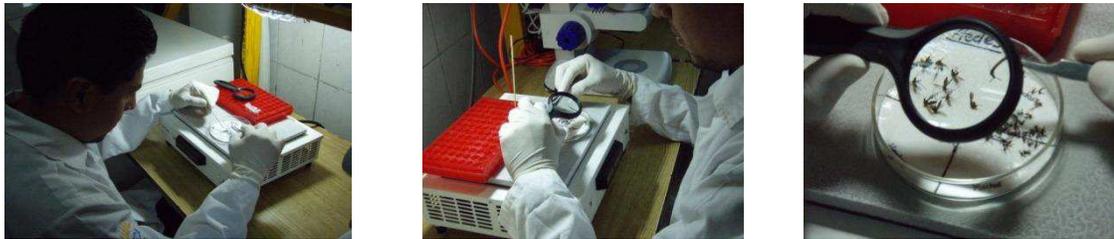


Figura 17. Todo el proceso de separación e identificación se realiza en frío, utilizando una plancha fría (chill table), la manipulación del material colectado es mediante pinzas y agujas entomológicas, es preferible hacer la identificación taxonómica con lupa siempre y cuando lo permita la especie de estudio. Fotos por Ewry A. Zárate Nahón.

Se rotuló cada microtubo correctamente y se almacenó a -80°C hasta su análisis con técnicas moleculares (figura 18).



Figura 18. Los microtubos rotulados se colocan en criocajas también rotuladas con los datos del proyecto y se almacenan a -80°C para su próximo análisis. Fotos por Ewry A. Zárate Nahón.

Línea C6/36

La línea celular C6/36 (Igarashi, 1978) es una clona obtenida de la línea original de *Ae. albopictus* establecida por Singh y Pavri (1967) que presenta una alta sensibilidad a los virus dengue (Kuno et al., 1985). Algunas cepas de dengue son capaces de producir efecto citopático de tipo sincicial.

La línea celular C6/36 se cultiva en medio MEM Earle o Leibovitz L-15 suplementado con 5 -10% de suero fetal bovino (SFB) y se inoculan a temperatura ambiente (25-28°C) sin requerimiento de atmosfera de CO₂ y en botellas de cultivo cerradas (figura 19). El subcultivo se realiza por “split” proporcional (1:10 semanalmente), agitando la botella de cultivo y permitiendo que el medio caiga de forma perpendicular a la monocapa celular, también se puede raspar con un gendarme de hule. No se debe de triptinizar ni levantar con EDTA.

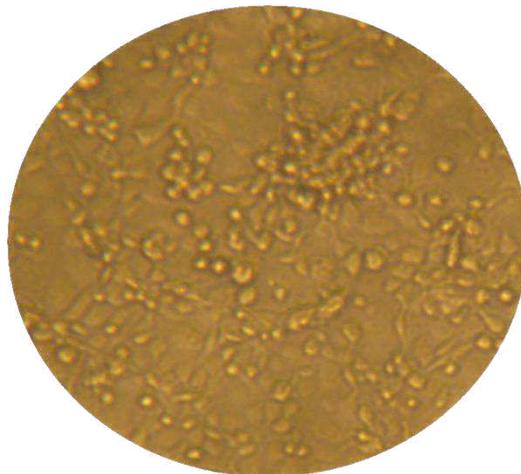


Figura19. Fotografía de células C6/36 no infectados, creciendo en medioL-15 suplementado con 5% de SFB en ausencia de CO₂, en botellas de cultivo de 25 cm². Foto por Ewry A. Zárate Nahón.

Cultivo de células C6/36

Las células C6/36 se mantuvieron en medio L-15 haciendo el spit cada semana en botellas de 25cm² para la obtención de monocapas semiconfluentes. Los tubos se cultivan en una incubadora seca (humedad relativa 0%) en ausencia de CO₂ entre 26 y 28 °C. las células fueron levantadas de la botella de cultivo por agitación o por raspado con gendarme de hule.

Virus

Las cepas de dengue utilizadas como controles positivos en esta investigación fueron: H-159911 (DENV-1), H-17247 (DENV-2), H-25924A (DENV-3), H-87 (DENV-3) y H-241 (DENV-4). Todas fueron aisladas a partir de sueros de pacientes virémicos, en cultivos de células C6/36, serotipificadas por RT-PCR mediante el protocolo de Lanciotti (1992) y caracterizadas por inmunofluorescencia en el Laboratorio de Arbovirología del Centro de Investigaciones Regionales “Dr. Hideyo Noguchi” de la Universidad Autónoma de Yucatán, quien además, donó los virus para este trabajo.

Infección de células C6/36 con DENV

Las monocapas semiconfluentes fueron lavadas con PBS 1X, el cual, fue removido posteriormente por medio de aspirado. El medio de cultivo (botella de 25cm²) fue sustituido con medio para infección (L-15-2% SFB). El volumen de medio colocado

antes de colocar la alícuota viral fue de 2mL, a manera que se cubriera la monocapa. Después de colocar la alícuota de aislado viral infeccioso, se homogenizó mediante movimientos circulares, con el fin de distribuir las partículas virales en toda la superficie del cultivo.

Las células fueron incubadas a 37°C durante una hora para permitir la adsorción de las partículas virales. En algunos casos es necesario remover el medio viral después de la hora de incubación. Se realiza un lavado con PBS 1X (segundo lavado) para eliminar todas las partículas virales que no fueron adsorbidas. Por último se permite la infección viral entre 1 y 15 días, manteniendo el cultivo entre 26 y 28°C.

Detección de DENV en los adultos *Ae. aegypti* colectados

Los pools (rango 1-20 hembras) formados se procesaron, primero: las hembras de los pools se trituraron, utilizando un triturador de tejidos (Qiagen, Valencia, CA) en tubos Eppendorf de 2mL con 0.6mL de Medio Esencial Mínimo (MEM) el cual contenía 2% de suero fetal bovino (FBS; HyClone, Logan, UT), anti-hongos y anti-bacteriano (100 U/mL de penicilina, 100 g/mL de estreptomina, y 0,25 g/ml de anfotericina B). La mezcla resultante (macerado) se añadió a columnas QIAshredder (Qiagen, Valencia, CA), las columnas se centrifugaron a 14000 rpm durante 3 minutos a 4 ° C. Inmediatamente después, 0.3mL de macerado se transfirió a un tubo Eppendorf para la extracción de RNA, y el volumen restante fue almacenado a -70 ° C, como respaldo del pool original (figura 20).

El ARN viral se extrajo utilizando el kit RNeasy (Qiagen, Valencia, CA) siguiendo las instrucciones del fabricante. La RT-PCR y PCR se realizaron siguiendo el protocolo de Lanciotti (1992). El ARN obtenido en la RT-PCR fue amplificado utilizando los primers D1 (F) y D2 (R) que abarcaban una región de los genes de la cápside (C) y premembrana (PRM), estos genes están conservados en los cuatro serotipos del DENV, por lo tanto si se apreciara una positividad, eso indicaría que la muestra es positiva a dengue, sin embargo, no se conocería cual serotipo es el de la muestra, para ello; al producto resultante de dicha PCR, se somete a una segunda ronda de PCR en donde se incluyen los mismos cebadores (D1 y D2), además de DENV-TS1 TS4 los cuales son cebadores sero-especificos (Lanciotti et al., 1992), por lo cual, se utilizan para determinar el serotipo DENV. Los productos de amplificación obtenidos fueron analizados en gel de agarosa al 2% (Promega Corp., Madison, WI) que contenía bromuro de etidio.



Figura 20. Maceración de los mosquitos en medio L-15, utilizando un triturador de tejidos. El procedimiento se realiza en frío. Fotos por Rocío Ramírez Jiménez.

Análisis de datos

El análisis estadístico fue realizado mediante el software Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) 19.0 (Chicago, IL.). Se realizó Chi cuadrada con tablas de contingencia de 2x2, esto, para determinar la posible asociación entre la cantidad de criaderos potenciales, criaderos positivos y el número de criaderos en los sitios no domiciliarios estudiadas. Un análisis similar se realizó para determinar la preferencia (cuarto) de descanso y alimentación de *Ae. aegypti* en los sitios visitados. Además, se uso un ANOVA para comparar la media del vector capturado en cada sitio no domiciliar. Se consideró un nivel de significancia de $P < 0.05$.

RESULTADOS

Presencia de criaderos y adultos *Ae. aegypti*, colectados en sitios no domiciliarios

El presente trabajo se realizó en 141 sitios no domiciliarios. Se visitaron 33 (23.4%) escuelas, 25 (17.7%) iglesias, 10 (7.1%) vulcanizadoras, 10 (7.1%) fábricas, 23 (16.3%), áreas comerciales, 3 (2.1%) centrales de autobuses, 12 (8.5%) yonkes (deposito de autos chatarra), 7 (5%) bibliotecas públicas, 8 (5.7%) sitios recreativos y 10 (7.1%) edificios del gobierno (tabla 3). Del total de los sitios muestreados, 112 (79.4%) presentaron criaderos potenciales y 68 (48.2%) presentaron criaderos positivos a *Ae. aegypti*.

De los sitios no domiciliarios evaluados, la totalidad (100%) de los edificios de gobierno, vulcanizadoras y yonkes mostraron criaderos potenciales; seguido por las escuelas con (88.8%), sitios recreativos (75%), iglesias (72%), fabricas (70%), áreas comerciales (69.6%), estaciones de autobuses (66.7%) y bibliotecas públicas (42.9%) (tabla 3). La prueba de chi cuadrada indicó que la presencia de criaderos potenciales es independiente del tipo de sitio no domiciliar evaluado ($\chi^2 = 0.38$, gl = 9, P = 0.3). En otras palabras la distribución de los criaderos potenciales fue prácticamente igual en todos los sitios no domiciliarios evaluados.

En cuanto a los criaderos positivos: las áreas recreativas mostraron 87.5%, seguido por los yonkes (75%), fabricas (60%), áreas comerciales (47.8%), escuelas

(45.5%), bibliotecas públicas (42.9%), vulcanizadoras y edificios de gobierno ambos con 40%, estaciones de autobuses (33.3%) y finalmente iglesias con 32% de criaderos positivos (tabla 3). La presencia de criaderos positivos fue independiente del tipo de sitio de estudio de acuerdo a la prueba chi-cuadrada ($\chi^2 = 12.571$, $gl = 9$, $P = 0.183$).

El análisis de datos para el tipo (categoría) de criadero mostró una mayor frecuencia de criaderos de tamaño pequeño 46.4% (97), seguido por los de tamaño medio 36.4% (76) y los criaderos grandes 13.4% (28), mientras que los contenedores atípicos representaron solo el 3.8% (8) (figura 21). En las bibliotecas públicas y centrales de autobuses se encontró que tuvieron 100% de criaderos pequeños. Los criaderos medianos y grandes se encontraron predominantemente en las áreas recreativas (50%) y vulcanizadoras (50%), seguidos por las escuelas (39.6%), yonkes (36.7%), así como vulcanizadoras (31.3%), yonkes (20%), sitios recreativos (16.7%) respectivamente (tabla 4). El análisis de chi cuadrada reveló que no existe una relación significativa entre el tamaño de los criaderos y el tipo de sitio no domiciliar estudiado ($\chi^2 = 0.012$, $gl = 9$, $P = 0.01$).

Además, de los criaderos encontrados y evaluados, la presencia de adultos *Ae. aegypti* fue notable en la mayoría de los sitios no domiciliarios. En 133 (94.3%) de los 141 sitios visitados se encontró hembras y machos de *Ae. aegypti*. En el 100% de los edificios de gobierno, áreas comerciales, sitios recreativos y bibliotecas públicas, fue colectado el vector; seguido por: escuelas (90%), iglesias (92%), fabricas (90%), vulcanizadoras (90%), yonkes (83.3%) y estaciones de autobuses con el 66.7% (tabla 3).

Desde el punto de vista epidemiológico las escuelas son los sitios no domiciliarios que producen mayor cantidad de *Ae. aegypti* con una media de 51.5 (± 65.0), incluyendo 21.6 (± 30.4) de hembras y 30 (± 35.2) machos, respectivamente.

Tabla 3. Resumen de resultados de la evaluación entomológica realizadas en 141 sitios no domiciliarios del área metropolitana de Monterrey N.L. México. Periodo de colecta Agosto 2009 – Noviembre 2010.

Sitio no domiciliar	n	%	Criaderos potenciales (%)		Criaderos positivos (%)		Número de sitios con adultos Ae. aegypti (%)		Media y (DS) del número total de adultos de Ae. aegypti		Media y (DS) de hembras Ae. aegypti		Media y (DS) de machos de Ae. aegypti		No.(%) de pools positivos a DENV	
Escuelas	33	23.4	28	(88.8)	15	(45.5)	32	(96.9)	51.5	(65.0)	21.6	(30.4)	30	(35.2)	0	(0)
Iglesias	25	17.7	18	(72)	8	(32.0)	23	(92.0)	20.2	(17.3)	10.0	(10.5)	10.2	(7.7)	0	(0)
Vulcanizadoras	10	7.1	10	(100)	4	(40.0)	9	(90.0)	19.7	(25.5)	8.6	(14.3)	11.1	(11.7)	0	(0)
Fabricas	10	7.1	7	(70)	6	(60.0)	9	(90.0)	18.1	(14.9)	6.4	(6.3)	11.7	(8.9)	0	(0)
Áreas comerciales	23	16.3	16	(69.6)	11	(47.8)	23	(100.0)	15.6	(13.9)	5.3	(6.2)	10.3	(8.7)	0	(0)
Centrales de autobuses	3	2.1	2	(66.7)	1	(33.3)	2	(66.7)	3.3	(2.9)	1.7	(1.5)	10.6	(11.5)	0	(0)
Yonkes	12	8.5	12	(100)	9	(75.0)	10	(83.3)	15.9	(18.6)	5.3	(7.1)	10.6	(11.5)	0	(0)
Bibliotecas públicas	7	5.0	3	(42.9)	3	(42.9)	7	(100.0)	18.0	(14.0)	7.1	(6.0)	10.9	(8.8)	0	(0)
Sitios recreativos	8	5.7	6	(75)	7	(87.5)	8	(100.0)	22.4	(8.6)	10.4	(6.3)	12.0	(3.9)	0	(0)
Edificios de gobierno	10	7.1	10	(100)	4	(40.0)	10	(100.0)	15.4	(15.1)	9.6	(9.8)	5.8	(5.7)	0	(0)
Total	141	100	112	(79.4)	68	(48.2)	133	(94.3)								

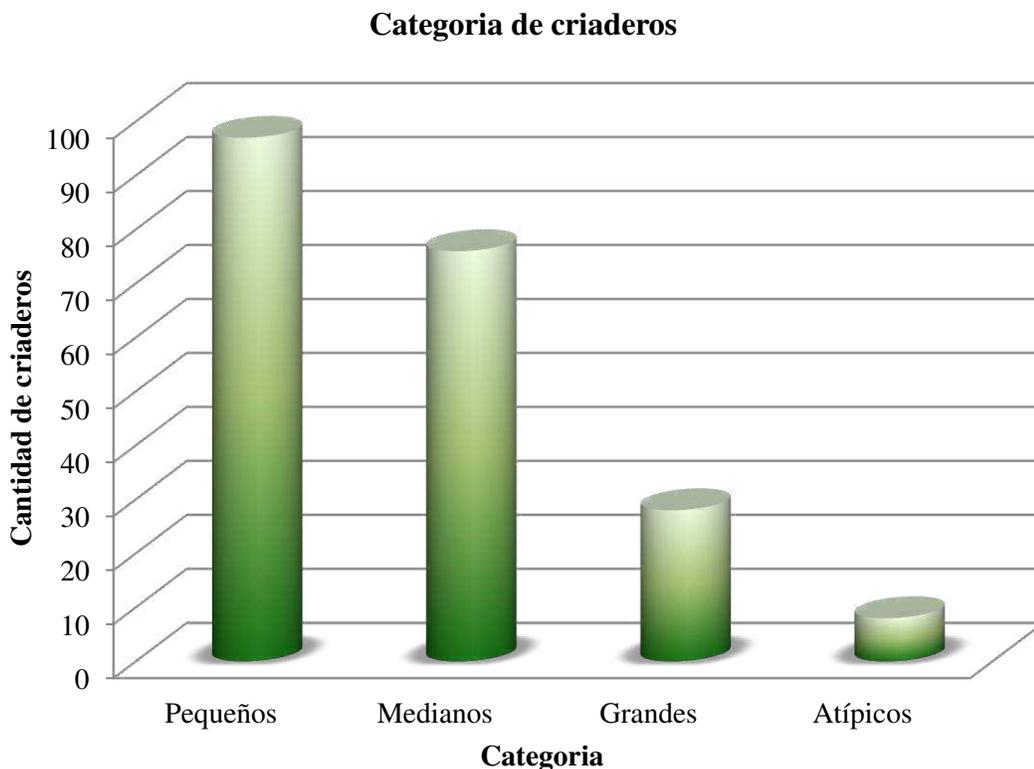


Figura 21. Frecuencias de categorías de criaderos encontrados en los sitios no domiciliarios evaluados en el área metropolitana de Monterrey, N.L. México. Periodo de colecta Agosto 2009 – Noviembre 2010.

Los mosquitos colectados en el resto de los sitios mostraron los siguientes resultados: sitios recreativos 22.4 (± 8.6), iglesias 20.2 (± 17.3), vulcanizadoras 19.7 (± 25.5), fabricas 18.1 (± 14.9), bibliotecas públicas 18.0 (± 14.0), yonkes 15.9 (± 18.6), áreas comerciales 15.6 (± 13.9), edificios de gobierno 15.4 (± 15.1) y finalmente estaciones de autobuses 3.3 (± 2.9) (tabla 3).

En general, la distribución por géneros mostró cierta similitud de machos (57.5%) y hembras (42.5%) en todos los sitios de colecta.

Tabla 4. Número de criaderos por categoría observados en las visitas y colectas en sitios no domiciliarios del área metropolitana de Monterrey, N.L. México. Periodo de colecta Agosto 2009 – Noviembre 2010.

Sitio de colecta	Categoría de criadero*			
	Pequeño Número (%)	Mediano Número (%)	Grande Número (%)	Atípico Número (%)
Escuelas	24 (45.3)	21 (39.6)	7 (13.2)	1 (1.3)
Iglesias	17 (50.0)	12 (35.3)	4 (11.8)	1 (2.9)
Vulcanizadora	3 (18.7)	8 (50.0)	5 (31.3)	0 (0)
Fabricas	6 (37.5)	5 (31.3)	2 (12.5)	3 (18.7)
Áreas comerciales	16 (53.3)	10 (33.3)	2 (6.7)	2 (6.7)
Central de autobuses	2 (100.0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Yonkes	12 (40.0)	11 (36.7)	6 (20.0)	1 (3.3)
Bibliotecas públicas	3 (100.0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Sitios recreativos	4 (33.3)	6 (50.0)	2 (16.7)	0 (0)
Edificios de gobierno	10 (76.9)	3 (23.1)	0 (0)	0 (0)
Total	97 (46.4)	76 (36.4)	28 (13.4)	8 (3.8)

*Ver tabla 2

Patrones de uso interiores de *Ae. aegypti* en los sitios no domiciliarios

Se llama patrones de uso interiores al área dentro de las construcciones en donde reposa o descansa el vector, es decir, a los cuartos o habitaciones en donde prefieren permanecer los mosquitos. Los datos analizados de todos los sitios no domiciliarios evaluados demostró que la mayoría de las hembras y los machos (42.8%) de *Ae. aegypti* prefieren descansar en los baños (figura 22), las oficinas (27.8%) y los salones de clases (14.3%) también fueron notablemente usados como sitios de reposo. En cuanto al resto de las áreas de reposo (cuartos) se distribuyó de la siguiente manera: almacenes (6.1%), cafeterías (4.6%), otros cuartos (2%), bibliotecas (1.5%), talleres (0.5%) y auditorios con

0.4% (tabla 5). El análisis estadístico mediante ANOVA indicó que existe una preferencia significativa de hembras y machos de *Ae. aegypti* por los baños y salones de clases como lugares de reposo en los sitios no domiciliarios estudiados en Monterrey y su área metropolitana.

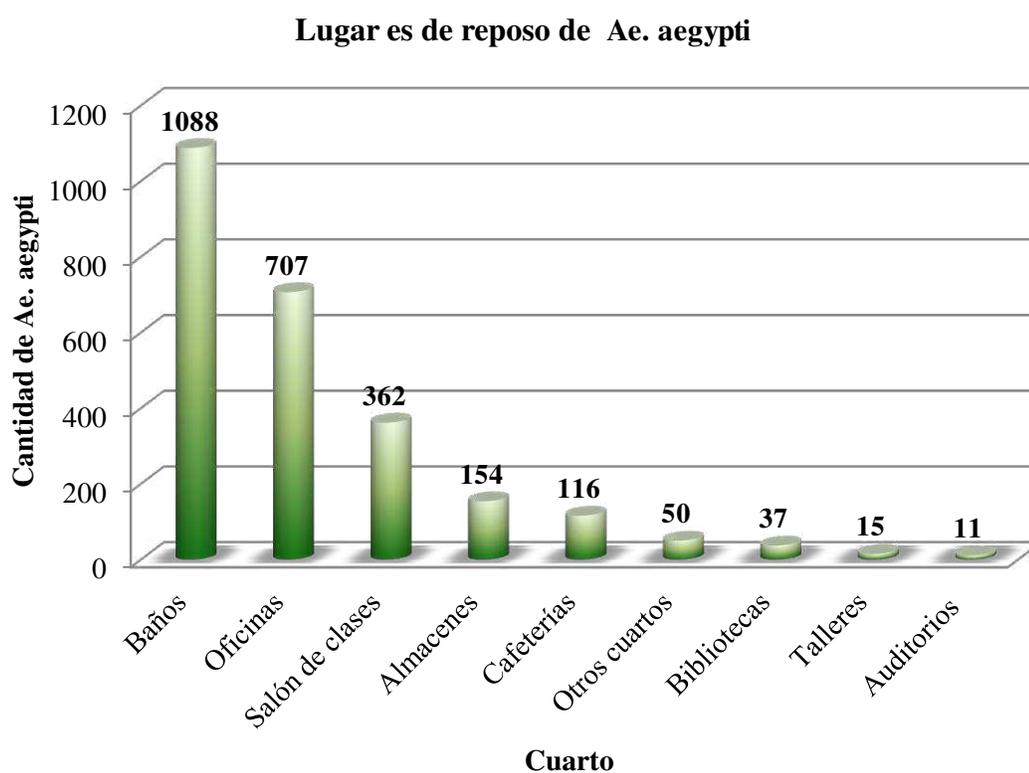


Figura 22. Patrones de uso de interiores de *Ae. aegypti* en los sitios no domiciliarios en el área metropolitana de Monterrey, N.L. México. Nótese que los baños fueron los cuartos con mayor cantidad del vector.

Tabla 5. Patrones de uso de interiores de *Ae. aegypti* en los sitios no domiciliarios en el área metropolitana de Monterrey, N.L. México.
Periodo de colecta Agosto 2009 – Noviembre 2010.

Cuarto	Total hembras y machos	Porcentaje del total (%)	Hembras		Machos	
			Número colectado	Porcentaje (%)	Número colectado	Porcentaje (%)
Baños	1088	42.8	430	38.5	658	46.3
Oficinas	707	27.8	288	25.8	419	29.4
Salones	362	14.3	185	16.6	177	12.4
Almacenes	154	6.1	87	7.8	67	4.7
Cafeterías	116	4.6	66	5.9	50	3.5
Otros cuartos	50	2.0	28	2.5	22	1.5
Bibliotecas	37	1.5	18	1.6	19	1.3
Talleres	15	0.5	9	0.8	6	0.4
Auditorios	11	0.4	6	0.5	5	0.4
Total	2540	100.0	1117	100.0	1423	100.0

Colecta de mosquitos en los sitios no domiciliarios

La colecta que se realizó en los 141 sitios no domiciliarios tanto en áreas urbanas y suburbanas del área metropolitana de Monterrey produjo lo siguiente: se colectó un total de 8,541 mosquitos (hembras y machos), de los cuales el 41.9% fue *Ae. aegypti*, 128 (0.6%) del vector potencial de dengue *Ae. albopictus* (Skuse). Como era de esperarse la especie con mayor colectas en los sitios no domiciliarios, fue *Culex quinquefasciatus* (Say) con 55.8% del total (figura 23 y 24). Otras especies de culícidos también fueron colectadas, tales como: *Psorophora cyanescens* (Coquillett) con 0.5% y *Anopheles quadrimaculatus* (Say) con 0.1% (tabla 6).

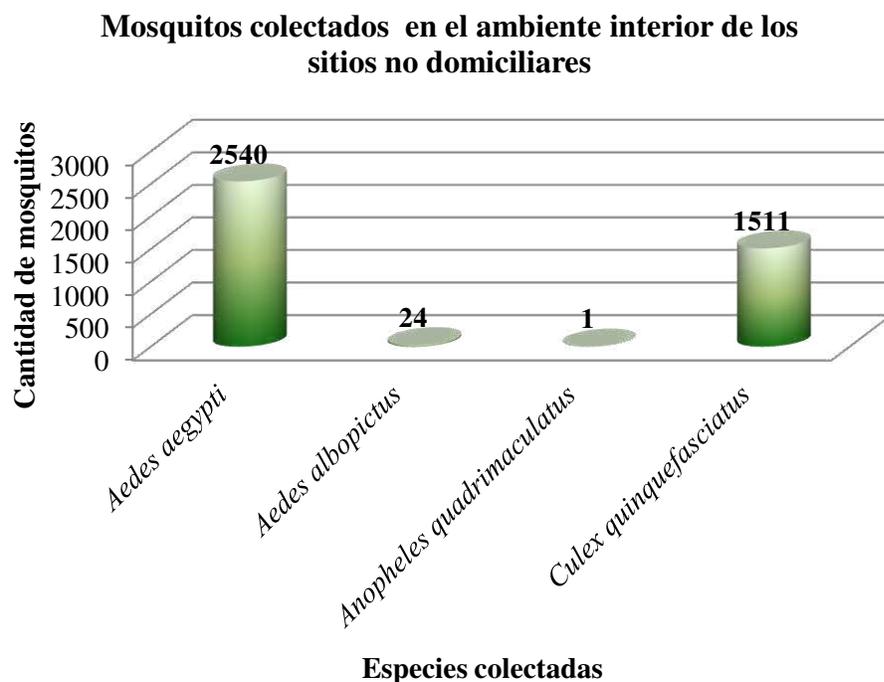


Figura 23. Mosquitos colectados (en reposo) en el ambiente interior de los sitios no domiciliare estudiados del área metropolitana de Monterrey, N.L. México.

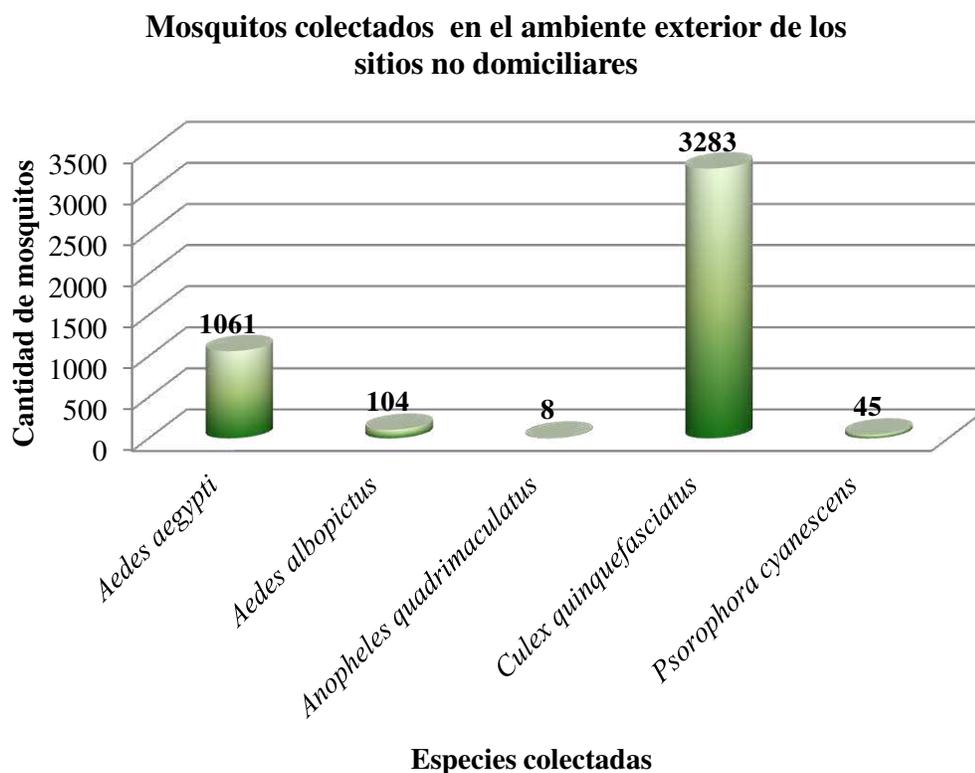


Figura 24. Mosquitos colectados (en reposo) en el ambiente exterior de los sitios no domiciliare estudiados del área metropolitana de Monterrey, N.L. México.

Tabla 6. Mosquitos colectados en sitios no domiciliarios en el área Metropolitana de Monterrey, N.L. México. Periodo de colecta Agosto 2009 – Noviembre 2010.

Especies y ambientes	Total hembras y machos	Hembras		Machos	
		Número	Porcentaje (%)	Número	Porcentaje (%)
Dentro					
Aedes aegypti	2540	1110	65.8	1430	59.8
Aedes albopictus	24	8	0.5	16	0.7
Anopheles quadrimaculatus	1	0	0	1	<0.1
Culex quinquefasciatus	1511	568	33.7	943	39.4
Total	4076	1686	100	2390	100
Fuera (jardín/patio)					
Aedes aegypti	1061	422	28.6	639	21.1
Aedes albopictus	104	48	3.3	56	1.9
Anopheles quadrimaculatus	8	4	0.3	4	0.1
Culex quinquefasciatus	3283	968	65.6	2315	76.5
Psorophora cyanescens	45	33	2.2	12	0.4
Total	4501	1475	100	3026	100

Infección por DENV en hembras *Ae. aegypti*

De los 1,532 hembras *Ae. aegypti* colectadas, se formaron 221 pools, los cuales fueron procesados por RT-PCR y PCR en busca de ARN de DENV utilizando el protocolo de Lanciotti (1992). Se encontró que de la totalidad de los pools formados de las colectas realizadas fueron negativo a DENV (figura 25 y 26).

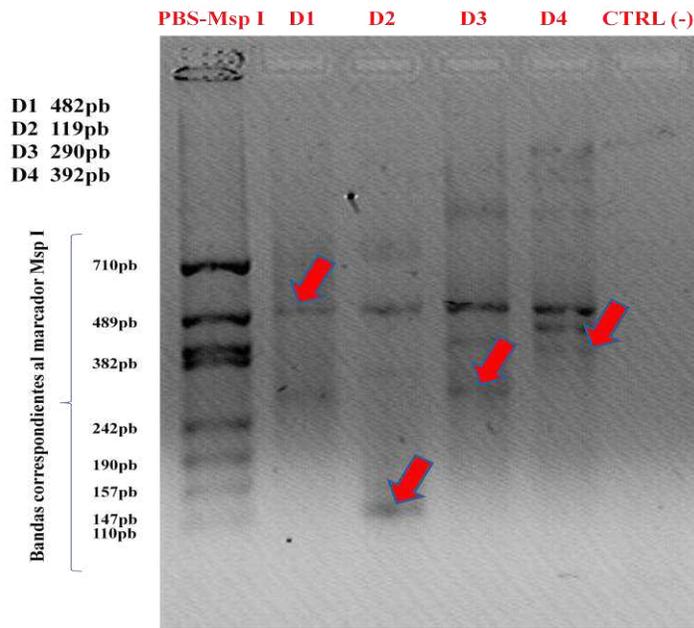


Figura 25. Gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio, que muestra el marcador de pares de bases (bp), los controles positivos de los 4 serotipos de dengue (D1-D4), con sus respectivas pb, por último se muestra el control negativo. La PCR fue hecha siguiendo el protocolo de Lanciotti (1992). Foto por: Ewry A. Zárate Nahón.

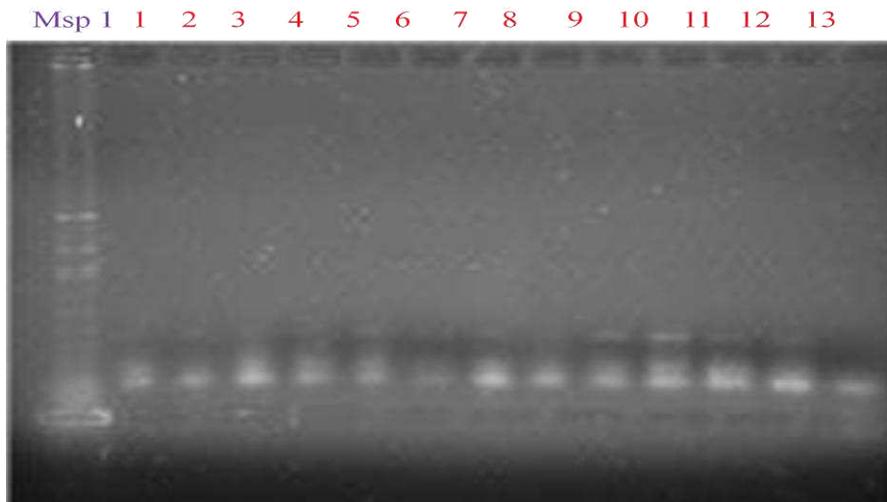


Figura 26. Gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio que muestra: uno de la totalidad de los gels en donde no se observó ninguna banda de 510pb, por lo tanto los pools procesados fueron negativos para virus dengue. Foto por: Ewry A. Zárate Nahón

DISCUSIÓN

Hasta la fecha de hoy no existe una vacuna segura y eficaz contra los cuatro serotipos de dengue, esto ha obstaculizado los intentos para detener completamente la propagación de la enfermedad en los países endémicos. Actualmente la prevención y control de los brotes locales y regionales está dirigida a la rápida eliminación de los mosquitos adultos y la supresión de los criaderos, así, como la eliminación de larvas del vector. Sin embargo, a pesar de los enormes presupuestos que el gobierno otorga a la aplicación de los programas de dengue las epidemias se mantienen cada año.

Quizás dentro de las estrategias usadas en dichos programas aún, no se ha comprendido que la propagación del dengue se trata de un fenómeno multifactorial patógeno-huésped, por lo tanto, un incremento en la eficacia del control de las poblaciones del vector tendrá un impacto sustancial en las tasas de morbilidad y mortalidad.

Los domicilios (casas) se han tomado prácticamente como regla que son los únicos puntos de contacto entre el mosquito *Ae. aegypti* y los humanos, ignorando los sitios no domiciliarios. Por lo tanto el ambiente domiciliar juega un papel importante en la transmisión del dengue, consecuentemente las estrategias de control han sido largamente focalizados en la conducta endofílica de los mosquitos hembras. Sin embargo, las carencias de un sistema eficaz de recolección de basura y la rápida expansión de las ciudades han aumentado el número de contenedores que pueden actuar

como sitios de ovoposición (criadero) de *Ae. aegypti*. Sin duda, estos sitios no domiciliarios reúnen un entorno de riesgo para recibir picaduras infectivas a dengue.

Los resultados obtenidos muestran que en los sitios no domiciliarios evaluados estuvieron presentes tanto criaderos (94.3%) como adultos del vector (68%). Los niños en edad escolar, indudablemente están expuestos a los hábitos de alimentación de de sangre de las hembras del vector, ya que el bioritmo de picadura (Chadee, 1988) coincide con el horario de mayor actividad escolar (8:00-10:30 horas). Lo anterior ya ha sido documentado recientemente en Mérida, Yucatán, México. (García-Rejón et al., 2011), en donde se muestrearon 24 escuelas de las cuales el 24.7% de ellas presento hembras *Ae. aegypti* con alimentación fresca, además, 11 escuelas (45.8%) presentaron hembras del vector infectadas con virus dengue.

La presencia del vector de dengue también ha sido documentada en India por Sharma et al., (2001), en donde se condujo un estudio de presencia de *Ae. aegypti* usando el índice de contenedor (IC) en 12 escuelas y 13 hospitales, encontrando al vector en todos los sitios, con IC de 28.3% para escuelas y 45.1% de IC para hospitales. En Brasil Carvalho-Leandro et al., 2010 colocaron ovitrampas en hospitales y encontraron un 23.7% de positividad en las ovitrampas colocadas dentro de los edificios y un 64.0% de positividad en las ovitrampas colocadas fuera de las construcciones. En México, Lenhart et al., (2005) encontró más positividad a ovitrampas colocadas en el exterior (6.0%) que en el interior (4.5%). Estos estudios demuestran que las escuelas y hospitales son áreas de alta actividad del vector y deben ser supervisados y controlados por los sistemas de salud. Morrison et al., (2006) en Iquitos, Perú, muestreo escuelas, fabricas, puertos, mercados públicos, estaciones de gasolina, zonas comerciales, aeropuertos, etc. encontrando pupas y adultos de *Ae. aegypti* en la mayoría de los sitios.

Las zonas comerciales, las fabricas, sitios recreativos, edificios gubernamentales y granjas presentaron <56pupa/ha. En cuanto a los puertos y aeropuertos en India Gill et al., (2001) encontró un IC de 11 aeropuertos y 6 puertos marítimos analizados ha aumentado a través de los años. El presente estudio soporta la idea que *Ae. aegypti* se ha estado moviendo a través de las áreas no domiciliarias, debido a la alta aplicación de insecticidas.

Es interesante que la naturaleza de las hembras y los machos de *Ae. aegypti* coincida con los gradientes de humedad y temperatura que se encuentran en los baños, los cuales fueron los cuartos preferidos como lugar de reposo de los mosquitos (Clements, 1996). Los mismos patrones de uso de interiores fueron encontrados en las escuelas de Mérida, Yucatán (García-Rejón et al., 2011). Lo anterior era de esperarse ya que el mosquito vector tienen una marcada preferencia por sangre humana, lo cual incrementa la transmisión de DENV (Scott et al., 1993). Adicionalmente las condiciones físicas favorables in situ y la concentración humana en los sitios no domiciliarios destaca como principal factor atrayente para las hembras *Ae. aegypti*.

Los turnos matutinos en las empresas en donde hay un hacinamiento de trabajadores representan una fuente considerable de sangre para los mosquitos hematófagos. Condiciones similares de hacinamiento humano y mosquitos son encontrados en los templos religiosos, bibliotecas públicas, zona comerciales, que permanecen con las puertas abiertas. Además, como ya se ha mencionado las actividades humanas diarias están sincronizadas con el bioritmo de picadura del vector (Chadee, 1988). Los datos epidemiológicos sobre las distribuciones por intervalos de edad, muestran que el grupo de 15 a 45 años son el que presentó mayor número de casos DC y DH en México en la última década (CENA VECE, 2011). Es evidente que el grupo 15-

45 años incluye a las personas que pasan buena parte del día en actividades fuera del hogar, es decir, estudian, trabajan, etcétera. Bajo este escenario la transmisión del dengue es probable que se produzca en alguno de los sitios no domiciliarios antes mencionados. Adicionalmente, hay evidencia de baja abundancia de mosquitos en casas de Rio de Janeiro, Brasil; dicho estudio se realizó en un barrio bajo de Brasil, caracterizado por una concentración intensa de actividad comercial, escuelas y la principal estación de autobuses. Estos autores ponen de manifiesto el importante papel en la transmisión del dengue en los espacios públicos, donde el flujo humano es intenso, posiblemente más importante que los domicilios (Honório et al., 2009).

Aunque en este estudio no se encontró hembras *Ae. aegypti* infectadas naturalmente por DENV, se cree que es cuestión de poco tiempo para demostrar que los sitios no domiciliarios están contribuyendo a los brotes locales de dengue. Se estima que cerca del 50% de la superficie del área metropolitana de Monterrey está ocupada por viviendas, dejando el resto para áreas públicas, centros de trabajo, escuelas, terrenos baldíos, entre otros. Sin embargo, el concepto de “índice de casas” acuñado en las regulaciones de salud de la política de México (NOM-032-2010) se interpreta a aplicar el control de vectores sobre todo en los domicilios, dejando desatendidas las enormes superficies no domiciliarios.

CONCLUSIONES

1. Se demostró la presencia y abundancia de las poblaciones del vector del dengue (*Ae. aegypti*) mediante colectas en 141 sitios no domiciliarios, que incluyeron escuelas, centros de trabajos, centros religiosos, entre otros. Las escuelas fueron los sitios de mayor riesgo por la cantidad de *Ae. aegypti* colectados además de poseer características ambientales propicias para el establecimiento del vector y la transmisión de la enfermedad.
2. Se estandarizó el sistema de cultivo de la línea celular C6/36 y su infección tanto con sueros humanos o sobrenadantes de macerados de mosquitos que contengan partículas de DENV. Además el establecimiento de dicha línea celular permite la obtención de controles positivos para los cuatro serotipos de dengue, lo cual sirvió para la estandarización de la PCR.
3. Se estandarizó la extracción de RNA, la RT-PCR y la PCR para la detección del virus del dengue en muestras de mosquitos lo cual es una herramienta más para la vigilancia entomología rutinaria y para futuros trabajos que involucren búsqueda de mosquitos infectados con dengue.

4. No se logró la asociación espacial y temporal de casos humanos con dengue y presencia de hembras *Ae. aegypti* infectadas en los sitios no domiciliarios, puesto, que no se encontraron casos activos de la enfermedad y que además en dichos casos no se encontró al vector infectado.

Como conclusión general este estudio aporta fuerte evidencia de que los sitios no domiciliarios son sitios potenciales e incluso algunos de ellos son focos de transmisión activa de DENV. Por lo cual en los sitios no domiciliarios se debe de implementar programas de control especialmente diseñados para dichos sitios; que vigilen y controlen al vector del dengue y al resto de los mosquitos.

Más estudios epidemiológicos y entomológicos son exigidos en un corto período de tiempo para generar resultados más sólidos para evaluar el ciclo de transmisión del DENV fuera del ambiente domiciliar.

LITERATURA CITADA

- Arias CF, Preugschat F, Strauss JH. 1993. Dengue 2 virus NS2B and NS3 form a stable complex that can cleave NS3 within the helicase domain. *Virology*;193 (2):888-99.
- Barnes WJ, Rosen L. 1974. Fatal hemorrhagic disease and shock associated with primary dengue infection on a Pacific island. *Am J Trop Med Hyg*;23(3):495-506.
- Bartelma G, Padmanabhan R. 2002. Expression, purification, and characterization of the RNA 5'-triphosphatase activity of dengue virus type 2 nonstructural protein 3. *Virology* 299:122-132.
- Bates M. 1970. The natural history of mosquitoes. Gloucester, Mass. USA: 378.
- Bryant JE, Calvert AE, Mesesan K, Crabtree MB, Volpe KE, Silengo S, Kinney RM, Huang CY, Miller BR, Roehrig JT. 2007. Glycosylation of the dengue 2 virus E protein at N67 is critical for virus growth in vitro but not for growth in intrathoracically inoculated *Aedes aegypti* mosquitoes. *Virology* 366:415-423.
- Burke DS, Monath TP. 2001. Flaviviruses. In: Knippe DM, Howley PM, editors. *Fields Virology*. London-New York-Tokyo: Lippincott Williams & Wilkins; p. 1043-1125.
- Carvalho-Leandro D, Ribeiro AL, Vargas-Rodriguez JS, Acel AM, et al. 2010. Temporal distribution of *Aedes aegypti* Linnaeus (Diptera, Culicidae), in a Hospital in Cuiabá, State of Mato Grosso, Brazil. *Rev. Bras. Entomol.* 54(4):701-706.
- Carpenter S.J. y La Casse W.J. 1995. *Mosquitoes of North America* University of California Press.
- Panorama Epidemiológico de Dengue y Dengue hemorrágico, CENA VECE. 2011. Available at: http://www.dgepi.salud.gob.mx/denguepano/PANORAMAS_2011/PANORAMA%20DENGUE_SEMANA%52_2011.pdf

- Center for Disease Control (CDC). 1987. *Aedes aegypti*, Vector Topics No. 4 (U.S. Dept of Health Education and Welfare, Public Health Service) Atlanta, Georgia. pp. 80
- Center for Disease Control (CDC). 1987. *Aedes aegypti* in the Americas: Biology, Distribution and Public Health Importance. Division of Vector- Born Viral Disease. Fort Collins, Colorado. pp. 50.
- Chadee DD. 1988. Landing periodicity of the mosquito *Ae. aegypti* in Trinidad in relation to the timing of insecticidal space-spraying. *Med Vet Entomol*; 2:189-192.
- Clark GG, Seda H, Gubler DJ. 1994. Use of the “CDC backpack aspirator” for surveillance of *Aedes aegypti* in San Juan, Puerto Rico. *J Am Mosq Control Assoc*; 10:119-124.
- Clements AN. 1996. The biology of mosquitoes. Development, nutrition and reproduction. London: Chapman and Hall.
- Condit RC. 2001. Principles of Virology. In: Howley PM, editor. *Fields Virology*. Fourth edition ed. London-New York-Tokyo: Lippincott Williams & Wilkins.
- Condon R, Taleo G, Stewart T, Sweeney T, Kiedrzyński T. 2000. Dengue surveillance in the Pacific Islands. *Pac Health Dialog*;7(2):122-6.
- Contreras, 1995. Listado preliminar de Fauna Silvestre del Estado de Nuevo León, México. Consejo Consultivo Estatal para la Preservación y Fomento de la Flora y Fauna Silvestre de Nuevo León. pp. 74-97.
- Costa CA, Santos IG, Barbosa MD. 2009. Detection and typing of Dengue viruses in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) in the City of Manaus, State of Amazonas. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 42(6), 677-681.
- Clyde K, Kyle JL, Harris E. 2006. Recent advances in deciphering viral and host determinants of dengue virus replication and pathogenesis. *Journal of Virology, American Society for Microbiology*, 80(23), 11418-11431.
- Cummings DA, Irizarry RA, Huang NE, Endy TP, Nisalak A, et al. 2004. Travelling waves in the occurrence of dengue haemorrhagic fever in Thailand. *Nature* 427:344– 47.
- Darsie RF, Ward RA. 2005. Identification and Geographical Distribution of the Mosquitoes of North America, North of Mexico. Gainesville, FL: University Press of Florida.

- Deen JL, Harris E, Wills B, Balmaseda A, Hammond SN, Rocha C, Dung NM, Hung N T, Hien TT, Farrar J. 2006. The WHO dengue classification and case definitions: time for a reassessment. *The Lancet*. Academic Press, New York.
- Falgout B, Pethel M, Zhang YM, y Lai CJ. 1991. Both nonstructural proteins NS2B and NS3 are required for the proteolytic processing of dengue virus nonstructural proteins. *Journal of Virology*. 65:2467–2475.
- Favier C, Schmit D, Muller-Graf CDM, Cazelles B, Degallier N, et al. 2005. Influence of spatial heterogeneity on an emerging infectious disease: the case of dengue epidemics. *Proc. Biol. Sci.* 272:1171–77
- Fine PEM. 1993. Herd immunity: history, theory, practice. *Epidemiologic Reviews*. Oxford Journals. 15:265–302.
- García I. 1977. Fauna cubana de mosquitos y sus criaderos típicos. Academia de Ciencias de Cuba. 136 pp.
- García-Rejon J, Loroño-Pino MA, Farfan-Ale JA, Flores-Flores L, Del Pilar Rosado-Paredes E, Rivero-Cardenas N, Najera-Vazquez R, Gomez-Carro S, Lira-Zumbardo V, Gonzalez-Martinez P, Lozano-Fuentes S, Elizondo-Quiroga D, Beaty B, Eisen L. 2008. Dengue virus-infected *Aedes aegypti* in the home environment. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 79(6), 940-50.
- García-Rejón JE, Loroño-Pino MA, Farfán-Ale JA, Flores-Flores LF, et al. 2011. Mosquito Infestation and Dengue Virus Infection in *Ae. aegypti* Females in Schools in Mérida, México. *Am J Trop Med Hyg*; 84:489-496.
- Gill KS, Sharma SK, Katyal R, Kumar K. 2001. Rising Trend of *Aedes aegypti* Indices at Various International Ports and Airports of India. *Dengue Bull.* 25:116-118.
- Graham H. 1903. The dengue. A study of its pathology and mode of propagation. *J Trop Med*; 6:209.
- Gómez-Dantés, Rodríguez MH. 1994. Paludismo y Dengue: de la erradicación a las zonas de riesgo. Cuadernos de Salud. Secretaría de Salud, México: 10, 55.
- Gubler DJ. 1998. Dengue and dengue hemorrhagic fever. *Clin Microbiol Rev*;11(3):480-96.

- Gubler DJ. 1997. Dengue and dengue hemorrhagic fever: its history and resurgence as a global public health problem. In: Gubler D, Kuno G, editors. *Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever*: CAB International; p. 1-22.
- Gubler DJ. 1998. The global pandemic of dengue/dengue haemorrhagic fever: current status and prospects for the future. *Ann Acad Med Singapore*; 27(2):227-34.
- Guha-Sapir D, Schimmer B. 2005. Dengue fever: new paradigms for a changing epidemiology. *Emerging Themes in Epidemiology*, (Open access journal, <http://www.ete-online.com/content/2/1/1>).
- Guzmán MG, Vazquez S, Martinez E, Alvarez M, Rodriguez R, Kouri G, et al. 1996. Dengue in Nicaragua, 1994: reintroduction of serotype 3 in the Americas. *Bol Oficina Sanit Panam*. 121(2):102-10.
- Guzmán MG, Kouri GP, Bravo J, Soler M, Vazquez S, Morier L. 1990. Dengue hemorrhagic fever in Cuba, 1981: a retrospective seroepidemiologic study. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 42:179-84.
- Guzmán MG, Rosario D, Mune M, Alvarez M, Rodriguez R, Kouri G. 1996. Genetic relatedness of the dengue 3 virus isolated in the outbreak of dengue hemorrhagic fever in Nicaragua, 1994. *Rev Cubana Med Trop*. 48(2):114-7.
- Guzmán MG, Kouri G, Bravo J, Valdes L, Vazquez S, Halstead SB. 2002. Effect of age on outcome of secondary dengue 2 infections. *International Journal of Infectious Disease* 6:118-24.
- Halstead SB. 1980. Dengue haemorrhagic fever--a public health problem and a field for research. *Bull World Health Organ*; 58(1):1-21.
- Halstead SB. 2008. *Dengue, Tropical Medicine: Science and Practice Vol. 5*. Editorial Imperial College Press. London, UK.
- Harwood RF y James MT. 1987. *Entomología Médica y Veterinaria*. UTEHA, Noriega Editores. México, D.F. pp. 201-272.
- Hammon WM, Rudnick A, Sather G, Rogers KD, Morse LJ. 1960. New hemorrhagic fevers of children in the Philippines and Thailand. *Trans Assoc Am Physicians*;73:140-155.
- Hammon WM. Dengue hemorrhagic fever-do we know its cause? *Am J Trop Med Hyg* 973;22(1):82-91.

- Honório NA, Nogueira RMR, Codeço CT, Carvalho MS, Cruz OG, et al. 2009. Spatial evaluation and modeling of dengue seroprevalence and vector density in Rio de Janeiro, Brazil. *PLoS Negl Trop Dis* 3(11): e545. doi:10.1371/journal.pntd.0000545
- Hospedales CJ. 1990. An update on Dengue fever in the Caribbean. *West Indian Med J*;39(2):131.
- Hwang JS, Hsu EL. 1994. Investigations on the distribution and breeding habitats of dengue vectors in Kaohsiung City. *Chin J Entomol*; 14:233-244.
- Igarashi A. 1978 Isolation of Singh's *Aedes albopictus* cell clone sensitive to dengue and chikungunya viruses. *J Gen Virol.* 40(3):531-44
- Instituto Nacional de Estadística y Geografía: Delimitación de las zonas metropolitanas de México-Monterrey. 2010. Available at:
<http://www.inegi.org.mx/sistemas/mexicocifras/default.aspx?e=19>
- Kanesa-Thanan N, Iacono-Connors L, Magill A, Smoak B, Vaughn D, Dubois D, et al. 1994. Dengue serotypes 2 and 3 in US forces in Somalia. *Lancet*;343(8898):678.
- Klungthong C, Zhang C, Mammen MP, Ubol S, Holmes EC. 2004. The molecular epidemiology of dengue virus serotype 4 in Bangkok, Thailand. *Virology*; 329(1):168-79.
- Kochel TJ, Watts DM, Halstead SB, Hayes CG, Espinosa A, et al. 2002. Effect of dengue-1 antibodies on American dengue-2 viral infection and dengue haemorrhagic fever. *Lancet* 360:310-12
- Kouri G, Guzman MG, Bravo J. 1986. Hemorrhagic dengue in Cuba: history of an epidemic. *Bulletin PAHO* 20:24-30.
- Kouri GP, Guzman MG, Bravo JR. 1987. Why dengue haemorrhagic fever in Cuba? 2. An integral analysis. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 81(5):821-3.
- Kuhn RJ, Zhang W, Rossmann MG, Pletnev SV, Corver J, Lenches E, Jones CT, Mukhopadhyay S, Chipman PR, Strauss EG, Baker TS, Strauss JH. 2002. Structure of dengue virus: implications for flavivirus organization, maturation, and fusion. *Cell* 108:717-725.

- Kuno G, Gluber DJ, Vélez M, Oliver A. 1985. Comparative sensitivity of three mosquito cell lines for isolation of dengue viruses. *Bull World Health Organ.* 63(2):279-86.
- Lanciotti RS, Calisher CH, Gubler DJ, Chang GJ, et al. 1992. Rapid detection and typing of dengue viruses from clinical samples by using reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *J Clin Micro;* 30:545-551.
- Leitmeyer KC, Vaughn DW, Watts DM, Salas R, Villalobos I, de C, et al. 1999. Dengue virus structural differences that correlate with pathogenesis. *J Virol;*73(6):4738-47.
- Lenhart AE, Walle M, Cedillo H, Kroeger A. 2005. Building a better ovitrap for detecting *Aedes aegypti* oviposition. *Acta Tropica* 96:56-59.
- Li H, Clum S, You S, Ebner KE, y Padmanabhan R. 1999. The serine protease and RNA-stimulated nucleoside triphosphatase and RNA helicase functional domains of dengue virus type 2 NS3 converge within a region of 20 amino acids. *Journal of Virology.* 73:3108–3116.
- Lourenço-de-Oliveira R, Honorio NA, Castro MG, Schatzmayr HG, Miagostovich MP, Alves JCR, Silva WC, Leite P. 2002. Dengue virus type 3 isolation from *Aedes aegypti* in the municipality of Nova Iguaçu, State of Rio de Janeiro. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz,* 97(6), 799-800.
- Maguire T, Miles JA, Macnamara FN, Wilkinson PJ, Austin FJ, Mataika JU. 1974. Mosquito-borne infections in Fiji. V. The 1971-73 dengue epidemic. *J Hyg (Lond);* 73(2):263-70.
- Martini E. 1935. *Los mosquitos de México, México, D.F.* pp. 5-7.
- Méndez F, Barreto M, Arias JF, Rengifo G, Muñoz J, Burbano ME, Parra B. 2006. Human and mosquito infections by dengue viruses during and after epidemics in a dengue-endemic region of Colombia. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene,* 74(4), 678-83.
- Messer WB, Gubler DJ, Harris E, Sivananthan K, de Silva AM. 2003. Emergence and global spread of a dengue serotype 3, subtype III virus. *Emerg Infect Dis;* 9(7): 800 - 9.

- Messer WB, Vitarana UT, Sivananthan K, Elvtigala J, Preethimala LD, Ramesh R, et al. 2002. Epidemiology of dengue in Sri Lanka before and after the emergence of epidemic dengue hemorrhagic fever. *Am J Trop Med Hyg*; 66(6):765-73.
- Modis Y, Ogata S, Clements D, Harrison SC. 2003. A ligand- binding pocket in the dengue virus envelope glycoprotein. *Proceedings of the National Academy of USA* 100:6986–6991.
- Mora-Covarrubias A, Jiménez-Vega F, Treviño-Aguilar SM. 2010. Distribución geoespacial y detección del virus del Dengue en mosquitos *Aedes* (*Stegomyia*) *aegypti* de Ciudad Juárez, Chihuahua, México. *Salud pública de México*, 52(2), 127-133.
- Morrison AC, Sihuíncha M, Stancil JD, Zamora E, et al. 2006. *Ae. aegypti* (Diptera: Culicidae) production from non-residential sites in the Amazonian city of Iquitos, Peru. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*; 100:73-86.
- Neff JM, Morris L, Gonzalez-Alcover R, Coleman PH, Lyss SB, Negron H. 1967. Dengue fever in a Puerto Rican community. *American Journal of Epidemiology* 86:162–84.
- Nelson MJ. 1986. *Aedes aegypti*: Biología y Ecología. Organización Panamericana de la Salud. REF: PNSP/86-93. Washington, D.C: 50.
- Norma Oficial Mexicana NOM-032-SSA2-2010, Para la vigilancia epidemiológica, prevención y control de enfermedades transmitidas por vector. 2010 Available at: <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/032ssa202.html>
- Nuegoonpipat A, Berlioz-Arthaud A, Chow V, Endy T, Lowry K, Mai le Q, et al. 2004. Sustained transmission of dengue virus type 1 in the Pacific due to repeated introductions of different Asian strains. *Virology*; 329(2):505-12.
- Oldstone MBA. 2002. *Virus, pestes e historia*. Fondo de Cultura Económica. México: 67 – 101
- Osanaí CH, Travassos da Rosa AP, Tang AT, do Amaral RS, Passos AD, Tauil PL. 1983. Dengue outbreak in Boa Vista, Roraima. Preliminary report. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*; 25(1):53-4.

- Organización Mundial de la Salud (OMS). 1997. Dengue haemorrhagic fever: diagnosis, treatment, prevention and control, 2nd ed. Organización Mundial de la Salud, Ginebra.
- Organización Mundial de la Salud (OMS). 2009. Dengue: Guías para el diagnóstico, tratamiento, prevención y control. Programa Especial para la Investigación y Capacitación de Enfermedades Tropicales UNICEF-PNUD-Banco Mundial-OMS.
- PAHO. 1977. Dengue in the Caribbean. Proceedings of a Workshop held in Montego Bay, Jamaica, 8-11 May, 1978. PAHO Scientific Publication 375. 1979.
- Pinheiro VCS, Tadei WP, Barros PMSS, Vasconcelos PFC, Cruz ACR. 2005. Detection of Dengue virus serotype 3 by reverse transcription-polymerase chain reaction in *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae) captured in Manaus, Amazonas. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 100(8), 833-839.
- Platt KB, Linthicum KJ, Myint KSA, Innis BL, Lerdthusnee KI, Vaughn DW. 1997. Impact of dengue virus infection on feeding behaviour of *Aedes aegypti*. *Am J Trop Med Hyg.* 57: 119 - 125.
- Pant CP, Yasuno M. 1973. Field studies on the gonotrophic cycle of *Aedes aegypti* in Bangkok, Thailand. *Journal of Medical Entomology.* 10:219–23
- Perera R, Kuhn RJ. 2008. Structural proteomics of dengue virus. *Current Opinion in Microbiology*, 11(4), 369-377.
- Reiter P, Amador MA, Anderson RA, Clark GG. 1995. Dispersal of *Aedes aegypti* in an urban area after blood feeding as demonstrated by rubidium - marked eggs. *Am J Trop Med Hyg* 52: 177 - 179.
- Rice CM. 1990. Overview of flavivirus molecular biology and future vaccine development via recombinant DNA. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*; 21(4):670-7.
- Rico-Hesse R. 1990. Molecular evolution and distribution of dengue viruses type 1 and 2 in nature. *Virology*; 174(2):479-93.
- Rigau-Perez JG, Clark GG, Gubler DJ, Reiter P, Sanders EJ, Vorndam AV. 1998. Dengue and dengue haemorrhagic fever. *Lancet*;352(9132):971-7.
- Rigau-Perez J. 2006. Severe Dengue: the need for new case definitions. *Lancet Infectious Diseases*, 6:297–302.

- Rocco IM, Kavakama BB, Santos CL. 2001. First isolation of dengue 3 in Brazil from an imported case. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*; 43(1):55-7.
- Rodenhuis-Zybert IA, Wilschut J, Smit JM. 2010. Dengue virus life cycle: viral and host factors modulating infectivity. *Cellular and molecular life sciences CMLS*, 67(16), 2773-2786.
- Rodier GR, Parra JP, Kamil M, Chakib SO, Cope SE. 1995. Recurrence and emergence of infectious diseases in Djibouti city. *Bull World Health Organ*; 73(6):755-9.
- Rosen L, Shroyer DA, Tesh RB. et al. 1983 Transovarial transmission of dengue viruses by mosquitoes: *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti*. *Am J Trop Med Hyg.* 32: 11108 1119.
- Sabin AB. 1950. The dengue group of viruses and its family relationships. *Bacteriol Rev*; 14(3):225-32.
- Sabin AB. 1952. Research on dengue during World War II. *Am J Trop Med Hyg*; 1(1):30-50.
- Saugrain J, Moreau JP, Rosen L. 1973. Dengue epidemic in Tahiti in 1971. Evolution of hemorrhagic tendency and comparisons with previous epidemics. *Bull Soc Pathol Exot Filiales*; 66(3):381-5.
- Scott TW, Chow E, Strickman D, Kittayapong P, et al. 1993. Blood-feeding patterns of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) collected in a rural Thai village. *J Med Entomol.* 30:922-927.
- Secretaría de Salud. 2009. Manual para la vigilancia, Diagnóstico y Control del Dengue. México.
- Service MW. 1992. Importance of ecology en *Aedes aegypti* control. *Southeast Asia J Trophe Med Public Health* 23: 681 - 689.
- Sharma RS, Panigrahi N, Kaul SM. 2001. *Aedes aegypti* prevalence in hospitals and schools, the priority sites for DHF transmission in Delhi, India. *Dengue Bull*; 25:107-108.
- Singh KR, Pavri KM. 1967. Experimental studies with chikungunya virus in *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. *Acta Virol.* 11(6):517-26
- Thomas SJ, Strickman D, Vaughn DW. 2003. Dengue epidemiology: virus epidemiology, ecology, and emergence. *Adv Virus Res*; 61:235-89.

- Urdaneta-Marquez, L, Failloux AB. 2011. Population genetic structure of *Aedes aegypti*, the principal vector of dengue viruses. *Infection, Genetics and Evolution*, 11(2), 253-261.
- Vargas L, Martínez-Palacios A. 1950. Estudios Taxonómicos de los Mosquitos Anofelinos de México. Secretaría de Salubridad y Asistencia México, D.F. pp. 142.
- Vilela APP, Figueiredo LB, Dos Santos JR, Eiras ÁE, Bonjardim CA, Ferreira PCP, Kroon EG. 2010. Dengue Virus 3 Genotype I in *Aedes aegypti* Mosquitoes and Eggs, Brazil, 2005–2006. *Emerging Infectious Diseases*, 16(6), 989-992.
- Watts DM, Porter KR, Putvatana P, Vasquez B, Calampa C, et al. 1999. Failure of secondary infection with American genotype dengue 2 to cause dengue haemorrhagic fever. *Lancet* 354:1431–44
- Yasuno M, Tonn RJ. 1970. A study of biting habits of *Aedes aegypti* in Bangkok, Thailand. *Bulletin WHO* 43:319–25.
- Yu IM, Zhang W, Holdaway HA, Li L, Kostyuchenko VA, Chipman PR, Kuhn RJ, Rossmann MG, Chen J. 2008 Structure of the immature dengue virus at low pH primes proteolytic maturation. *Science* 319:1834–1837.
- Zhang W, Chipman PR, Corver J, Johnson PR, Zhang Y, Mukhopadhyay S, Baker TS, Strauss JH, Rossmann MG, Kuhn RJ. 2003. Visualization of membrane protein domains by cryo-electron microscopy of dengue virus. *Nature Structural & Molecular Biology* 10:907–912.
- Zhang Y, Zhang W, Ogata S, Clements D, Strauss JH, Baker TS, Kuhn RJ, Rossmann MG. 2004. Conformational changes of the flavivirus E glycoprotein. *Nature Structural & Molecular Biology*. 12:1607–1618.
- Zybert IA, van de M, Wilschut J, Smit JM. 2008. Functional importance of dengue virus maturation: infectious properties of immature virions. *Journal of General Virology*. 89:3047–3051

RESUMEN BIOGRAFICO

Ewry Arvid Zarate Nahón

Candidato para el grado de:

Doctor en Ciencias Biológicas con acentuación en Entomología Médica

Tesis:

**POTENCIAL DE TRANSMISION DE DENGUE EN ZONAS NO
DOMICILIARES A TRAVES DE LA BUSQUEDA DE HEMBRAS *Ae. aegypti*
INFECTADAS POR VIRUS DEL DENGUE EN EL AREA METROPOLITANA
DE MONTERREY, NUEVO LEÓN, MÉXICO**

Campo de estudio: Biología y control de los principales vectores de virosis y parasitosis de México.

Datos personales: Nacido en Salina Cruz, Oaxaca, México, el 18 de Abril de 1984.

Educación: Químico Bacteriólogo Parasitólogo, Egresado de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

ANEXOS

CULTIVO CELULAR

1. SUPLEMENTO DE MEDIOS DE CULTIVO

Material

- ✓ Pipetas serológicas de 5mL. Marca Corning. Cat. 4487.
- ✓ Pipetas serológicas de 10mL. Marca Corning. Cat. 4488

Equipo

- ✓ Campana de flujo laminar
- ✓ Mechero bunsen
- ✓ Pipetor

Medio Leibovitz (L-15)

Reactivos

- ✓ Medio de cultivo Leibovitz (L-15) con L-Glutamina. 500mL. In vitro S.A cat. ME-040.
- ✓ Suero Bovino Fetal. 500 mL. Hyclone. Cat. Sh30396.03
- ✓ Solución de antibiótico –antimicótico (100X) Penicilina-Estreptomicina-Anfotericina B, 100 mL, In vitro S.A. Cat. A-07.
- ✓ Solución de aminoácidos no esenciales (100X) para medio mínimo esencial de Eagle, 100 mL, In vitro S.A. Cat. SR-05.
- ✓ Solución de bicarbonato de sodio al 7.5% esterilizado por membrana, 100mL, In vitro S.A.

Protocolo

1. Medio al 10% SBF para mantenimiento de células C6/36. Para suplementar 500 mL de medio L-15 al 10%, se requieren 50mL de Suero Bovino fetal inactivado, 5.5 mL de solución antibiótico/antimicótico (100X) y 5.5 mL de solución de aminoácidos no esenciales (concentración final 1X). El medio al 10% es el que se debe utilizar para subcultivar.
2. Medio al 2% SBF para infección viral de células C6/36. El medio de cultivo para la infección viral debe estar al 2% con respecto al SBF. A 500mL de medio L-15 se añaden 10mL SBF + 5mL de antibiótico/antimicótico + 5mL de aminoácidos no esenciales.

Observaciones

- ✓ Es fundamental usar un suero bovino fetal (SFB) compatible con las células C6/36 (Hyclone), Gibco e Invitrogen parecen no dar buenos resultados, observándose como las células comienzan a decaer después del tercer pasaje.
- ✓ El volumen de bicarbonato necesario para alcalinizar el medio es empírico dependiendo del lote adquirido: el medio debe tornarse color rojo grosella para poder ser utilizado. En general para 500mL de medio se añaden 3mL de solución de bicarbonato y lograr un pH de 7.2.
- ✓ El medio de cultivo puede irse alcalinizando con el abrir y cerrar continuo de los frascos que lo contienen. Para acidificar el medio se pueden emplear unas gotas de HCL 1M esterilizado por filtración con una membrana de 0.22 para mantener el ácido y el bicarbonato en refrigeración a 4° C.

2. MANTENIMIENTO DE LÍNEAS CELULARES

Fundamento

El subcultivo provee la oportunidad para expandir la población celular total, aplicar presión selectiva empleando en el medio un agente de selección y permitir la generación de cultivos replica para caracterización, experimentación, preservación y congelación. Cuando el cultivo se encuentra aproximadamente al 90% de confluencia, es necesario realizar su subcultivo para asegurar la formación de monocapas y evitar los cúmulos celulares. Los pasajes permiten mantener limpio el medio de cultivo y evitar la aglomeración de células, permitiendo que cada unidad de la monocapa reciba la misma concentración de nutrientes y se encuentre expuesta a las mismas condiciones que las demás células.

Material

- ✓ Pipetas serológicas de 5mL. Marca Corning. Cat. 4487
- ✓ Pipetas serológicas de 10 mL. Marca Corning. Cat.4488
- ✓ Pipetas serológicas de 2mL. Marca Fisherbrand. Cat. 13-678-11C
- ✓ Botellas para cultivo celular de 25cm².
 - a. Con filtro. marca Corning. Cat. 430639.
 - b. Con tapa de rosca. Marca Corning. Cat. 430168
- ✓ Botellas para cultivo celular de 75cm²
 - a. Con filtro. marca Corning. Cat. 430641.
 - b. Con tapa de rosca. Marca Corning. Cat. 430199
- ✓ Raspadores celulares (gendarmes) de 25 cm. Marca Corning. Cat. 3010
- ✓ Pipeta Pasteur. Marca Corning. Cat. 101001440.

Reactivos

- ✓ Medio de cultivo L-15 suplementado al 5% con suero bovino fetal.
- ✓ Solución buffer salinos de fosfatos (PBS) 1X
- ✓ Tripsina-EDTA 0.25% 500 mL. marca Gibco. Cat.15050057.
- ✓ Solución de bicarbonato de sodio al 7.5% esterilizado por membrana, 100mL, In vitro S.A.

Equipo

- ✓ Campana flujo laminar
- ✓ Bomba de vacío
- ✓ Centrífuga
- ✓ Incubadora sin tanque de CO₂
- ✓ Bomba de presión y vacío.

Protocolo para células C6/36

1. Golpear botella confluyente para eliminar células C6/36 que no se encuentren adheridas. Si no se va dividir el cultivo es innecesario golpear la botella.
2. Decantar medio de cultivo.
3. Añadir medio nuevo a la botella (L-15, 10% SBF. 25 CM² . 5mL medio , 75 cm², 10mL medio).
4. Golpear botella con medio nuevo. De ser necesario realizar raspado con gendarme para desprender la mayoría de las células. Hacer dilución 1:10 en botellas nuevas o dependiendo de la necesidad de botellas a sembrar.
5. Adjuntar volumen final en las botellas subcultivadas (25cm² 5mL medio , 75cm² . 10mL medio).
6. Al cultivo inicial añadir medio fresco y continuar creciendo.
7. Crecer a temperatura ambiente (23-24°C) con la tapa cerrada.
8. La botella sembrada alcanza confluencia entre 5 a 7 días, lo que permite hacer los subcultivos semanalmente.

Observaciones

- ✓ El medio debe estar al 10% con SBF para que las células crezcan.
- ✓ El número de pases es indistinto, se puede continuar cultivando a partir de la botella inicial. No tirar botellas a menos que sea necesario.
- ✓ Si se desea que las células crezcan más rápido, golpear vigorosamente la botella de cultivo.
- ✓ Si el pH del medio parece estar ácido (color amarillo) y la botella todavía no está confluyente, se puede alcalinizar a rojo de nuevo añadiendo unos cuantos micro-litros de bicarbonato de sodio al 75% estéril.
- ✓ Las células C6/36 prefieren el medio ácido cuando se encuentran en división, por lo que no afecta tanto el vire de coloración del medio en comparación con otras líneas celulares.

3. RECUENTO CELULAR

Fundamento

La técnica de recuento celular utilizando el hemocitometro o cámara de Neubauer fue diseñada por Louis-Charles Malasses. El dispositivo consta de una placa de vidrio con una cuadrícula grabada con láser en la cual es posible realizar el recuento de las células o partículas en un volumen específico de un fluido. [Strober W (2001). "Monitoring cell growth". In Coligan JE, Bierer BE, Margulies DH, Sherach EM, Strober W. Current Protocols in Immunology. 5. USA: Jhon Wiley and Sons p. A.2A.1.]

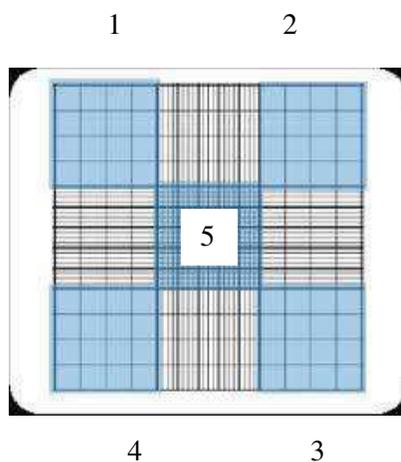


Figura 27. Cámara de Neubauer

Para facilitar el recuento de células viables se usa un colorante vital, el azul tripano. Las células vivas captarán el colorante, pero lo expelirán al medio, mientras que las células muertas lo mantendrán en su interior. Generalmente se preparan diluciones 1:4 o 1:8 de la suspensión celular a contabilizar. El resultado se obtiene multiplicando el número de células contadas en la cámara de Neubauer (figura 27) por el valor de la dilución realizada (4 u 8) por el valor del factor de la cámara (1×10^4).

Material

- ✓ Tubos Eppendorf de 0.2mL.
- ✓ Cultivos de células C6/36

Reactivos

- ✓ Medio de cultivo L-15 suplementado al 5% con suero fetal bovino.
- ✓ Colorante azul tripano. 100mL. Marca Gibco. Cat. 15250-061.

Equipo

- ✓ Campana de flujo laminar
- ✓ Micropipetas automáticas
- ✓ Cámara de Neubauer
- ✓ Microscopio

Protocolo

1. Procesar las botellas de cultivo hasta la resuspensión y disgregación en medio nuevo de las células. Procurar una disgregación completa, sin que el medio presente cúmulos del cultivo flotando o suspendidos.
2. Tomar una alícuota de 60 μ L de medio de cultivo nuevo y depositarla en un tubo cónico de 200 μ L.
3. Medir una alícuota de 10 μ L de la suspensión celular y depositarla en el tubo cónico de 200 μ L. Procurar homogenizar completamente antes de realizar la medición, puesto que de forma natural las células precipitan volviendo a formar el botón al fondo del tubo donde se centrifugaron.
4. Medir 10 μ L del colorante azul tripano y colocarla en el tubo cónico de 200 μ L.
5. Mezclar con ayuda de una puntilla de 200 μ L el volumen del tubo, subiendo y bajando su contenido sin formar burbujas.

6. Depositar 10 μL de la suspensión celular con colorante en la cámara de Neubauer.
7. Utilizando el objetivo de 10X en el microscopio, contar el número de células vivas en las cuatro cuadrículas de 4X4 de la cámara (figura 24, números 1, 2, 3 y 4). Registrar los números.
8. Contar el número de células en el cuadrante central de 5X5 (figura 24, número 5). Registrar la cantidad.
9. Realizar el cálculo total de las células empleando la siguiente fórmula:

$$\text{No. Células/mL} = (\text{promedio } 4 \times 4) (\text{factor de dilución}) (1 \times 10^4)$$

10. El numero obtenido con el promedio de las cuadrículas 4x4 debe ser similar al cálculo realizado con el total de células en la cuadrícula central de 5x5.
11. Multiplicar el número de células/mL por el volumen en el cual se resuspendieron y disgregaron las células producidas.
12. Con respecto al total de células contabilizadas y el volumen total, colocar el volumen correspondiente al número de células deseado en a botella o placa de cultivo.

4. CONGELACIÓN DE LÍNEAS CELULARES

Fundamento

Cuando una línea celular se expande en números suficientes, la congelación de células permite la generación de bancos que pueden almacenarse sin que el material envejezca. De esta forma las células también estarán protegidas de contaminación, fallas en la incubadora o agotamiento del medio de cultivo. Se recomienda congelar 1×10^6 – 1×10^7 células/mL en suero bovino fetal suplementado con un agente conservador (glicerol o DMSO) a una concentración del 5-10%, para proteger a las membranas del daño causado por los cristales del agua. La congelación debe ser lenta y se recomienda que el almacenamiento final se realice en un tanque de nitrógeno líquido, donde las células pueden permanecer viables durante varios años.

Material

- ✓ Cultivos celulares semiconfluentes
- ✓ Micropipetas
- ✓ Crioviales de 2 mL. Marca Corning. Cat. 430659
- ✓ Tubos falcon de 15 mL. Marca Corning. Cat. 430053.

Reactivos

- ✓ Suero bovino fetal 500 mL:
 - a) Para C6/36: Marca Hyclone.
- ✓ Dimetilsulfóxido (DMSO) grado Biología Molecular. 100mL. Marca Sigma. Cat. D2650.
- ✓ Hielo.

Equipo

- ✓ Campana de flujo laminar
- ✓ Bomba de presión y vacío
- ✓ Centrifuga
- ✓ Hielera
- ✓ Refrigerador de -20 – 0°C.
- ✓ Ultracongelador de -70°C.

Protocolo para células C6/36.

1. Cuando se observa un cultivo confluyente de células C6/36 en una botella de 25 cm², permitir que crezcan un día más.
2. Raspar las células de la botella con ayuda de un gendarme (cell scraper).
3. Colectar medio en tubo falcon y centrifugar a 2000 rpm durante 5 minutos. Si las células no han formado un pellet, centrifugar de nuevo.
4. Decantar medio de cultivo y resuspender en 2mL de suero bovino fetal completo.
5. Depositar en el criovial 900 µL de la suspensión celular y añadir 10 µL de DMSO.
6. Enfriar células a 4°C durante 5 minutos.
7. Pasar células a - 20°C durante dos horas. No exceder el tiempo.
8. Almacenar células a -70°C.
9. Se recomienda hacer pases de la línea celular cada 6 meses.

5. DESCONGELACIÓN DE LÍNEAS CELULARES

Fundamento

El proceso de congelación resulta estresante para las células. El uso de una buena técnica de descongelación asegura que una alta proporción de las células congeladas sobrevivan. Es importante evitar manipulaciones bruscas de los volúmenes de las alícuotas congeladas, ya que las membranas celulares se encuentran altamente sensibilizadas.

Material

- ✓ Pipetas serológicas de 5mL. Marca Corning. Cat 4487
- ✓ Botellas para cultivo celular de 25 cm².
 - a) Con filtro. Marca Corning. Cat. 430639
 - b) Con tapa de rosca. Marca Corning. Cat. 430168.

Reactivos

- ✓ Medio de cultivo
 - a) Para C6/36: L-15 suplementado al 5% con suero bovino fetal.

Equipo

- ✓ Campana de flujo laminar
- ✓ Micropipetas automáticas
- ✓ Microscopio
- ✓ Incubadora

Protocolo

1. Permitir atemperar el medio de cultivo a utilizar para sembrar las células al menos 40 minutos antes de la realización de la técnica. Después de sacar el medio del baño maría se debe limpiar con etanol al 70% antes de permitir su entrada a la campana de bioseguridad.
2. Depositar 5mL de medio de cultivo atemperado en una botella de 25cm².
3. Introducir criovial en baño de agua a 37° C hasta observar la descongelación de su contenido.
4. Depositar suavemente la alícuota completa del criovial y homogenizar el contenido de la botella con movimientos circulares suaves.
5. Revisar al microscopio las células recién depositadas en la botella de cultivo.
6. Incubar la botella de cultivo bajo las condiciones requeridas dependiendo del tipo de línea celular que se trate.

INFECCIÓN DE LÍNEAS CELULARES CON DENGUE

6. CULTIVO VIRAL: AMPLIFICACIÓN DEL VIRUS DEL DENGUE EN LÍNEAS CELULARES

Fundamento

El cultivo viral de dengue es el estándar de oro para la confirmación y aislamientos de casos positivos. Empleando líneas celulares permisibles como C6/36, TRA-284-SF, AP-61 o Vero se pueden obtener grandes cantidades de partículas virales viables a partir de aislados de pacientes o macerados de mosquitos.

El proceso involucra la obtención del cultivo celular semiconfluyente, la adición del suero infeccioso y la adsorción de las partículas virales en la membrana celular. Se permite que el virus se replique de 7 a 14 días dependiendo del serotipo presente para su posterior cosecha o análisis por inmunofluorescencia. Los virus del dengue suelen ser citopáticos.

El protocolo descrito en este anexo se adaptó empleando la línea celular C6/36 de *Aedes albopictus* y las cepas virales H-159911 de DENV-1 y H-17247 de DENV-2.

Material

- ✓ Pipetas serológicas de 5mL. Marca Corning . Cat. 4487.
- ✓ Pipetas serológicas de 2mL. Marca Fisherbrand. Cat. 11-678-11 C.
- ✓ Cultivos confluentes de células C6/36 en botellas sin filtro de 25cm².
- ✓ Virus prototipo Dengue 1 cepa H-159911 conservado a -80°C
- ✓ Virus prototipo Dengue 2 cepa H-17247 conservado a -80°C.

Reactivos

- ✓ Medio L-15 suplementado al 2% con suero bovino fetal.
- ✓ Solución buffer salino de fosfatos (PBS) 1X.

Equipo

- ✓ Campana de flujo laminar
- ✓ Pipetor

Protocolo

1. Sembrar células C6/36 hasta obtener una monocapa confluyente bajo las condiciones indicadas en el protocolo correspondiente.
2. Desechar medio de cultivo por decantación.
3. Lavar células con 3mL de solución PBS 1X para remover el detrito celular. Realizar movimientos circulares para limpiar la monocapa completa.
4. Remover PBS 1X
5. Recambiar medio por L-15 al 2% SBF, en un volumen adecuado para cubrir solamente las células (25 cm²: 2mL, 75 cm²: 3.5mL, tubo Nunc: 1mL).
6. Adicionar al medio 100-150 µL del aislado viral.
7. Homogenizar botella con movimientos circulares para asegurar que el virus tenga contacto con la monocapa celular completa.
8. Incubar a 37°C durante una hora al menos.
9. Transcurrida la hora de incubación, completar volumen del medio de cultivo a los indicadores en el aparato de subcultivo celular.
10. Incubar a temperatura ambiente sin fuente de CO₂.

Observaciones

- ✓ El medio de cultivo para infección viral debe estar al 2% SBF para permitir el mantenimiento celular pero evitar su división, permitiendo que el virus las infecte sin que mueran.
- ✓ Para cada serotipo viral utilizar una alícuota de medio distinta.
- ✓ Normalmente una botella de 25cm² se infecta con 30- 35 µL del aislado viral, pero la infección con 100 µL permite una producción mayor de partículas virales.
- ✓ Si durante el periodo de incubación el medio se toma ácido añadir unas gotas de la solución al 7.5% de bicarbonato de sodio para dejar el medio ligeramente alcalino.
- ✓ Si la infección se hace en tubos (Nunc, Nunclon surface), cultivar células a confluencia depositando 2.5 mL de la suspensión 1:10 de células proveniente de botella de 75cm² (medio 10% SBF). Antes de realizar la infección hacer el recambio al medio correspondiente. Si las células se encuentran muy crecidas vortexear el tubo para poder eliminar las células excedentes al momento de decantar el medio y dejar una monocapa en el tubo. Primero colocar 1mL del medio al 2% de SBF, infectar con 17µL del aislado viral e incubar a 37°C. Transcurrido el tiempo, completar el volumen de medio a 2.5mL.
- ✓ DENV prefiere un pH alcalino en el medio para infectar a las células C6/36.

7. COSECHA Y ALMACENAMIENTO DE AISLADOS VIRALES

Fundamento

Los virus en cultivos se pueden cosechar para establecer bancos con prototipos virales o para confirmar casos de pacientes enfermos por inmunofluorescencia o técnicas moleculares, dependiendo del serotipo infectante, el tiempo de cultivo varía. Generalmente dengue 1 y 2 son de crecimiento rápido y la mayoría son líticos, mientras que dengue 3 y 4 requieren más tiempo y no ocasionan cambios morfológicos tan notorios en la monocapa celular.

La suspensión células/virus se debe tratar con una mezcla de suero bovino fetal y bicarbonato de sodio para después almacenarse en un ultracongelador. Se puede realizar una purificación mayor al aislado por centrifugación diferencial.

Material

- ✓ Pipetas serológicas de 5mL. Marca Corning. Cat. 4487.
- ✓ Pipetas serológicas de 5mL. Marca Fisherbrand. Cat. 11-678-11C.
- ✓ Raspadores celulares (gendarmes) de 25cm. Marca Corning. Cat. 3010.
- ✓ Tubos falcon de 15mL. Marca Corning. Cat. 430053.
- ✓ Tubos Eppendorf de 1.5 mL estériles.

Reactivos

- ✓ Suero bovino fetal. 500mL. Hyclone. Cat. sh30396.03.
- ✓ Solución de bicarbonato de sodio al 7.5% esterilizado por membrana, 100mL, In vitro S.A.

Equipo

- ✓ Campana de flujo laminar
- ✓ Micropipetas automáticas
- ✓ Pipetor
- ✓ Hielera
- ✓ Ultracongelador de -70°C

Protocolo

1. Transcurridos de 12 a 15 días de la infección celular, se puede cosechar el virus.
2. Si el cultivo se hizo en tubo, vortexear para desprender las células. Si el cultivo se realizó en frascos, raspar con gendarme. No hacer lavados con PBS.
3. Recolectar medio de cultivo y centrifugar para empaquetar las células.
4. Del sobrenadante colocar alícuotas y si es necesario, reinfectar un cultivo nuevo con 100 μ L de ellos (botella de 25cm²).
5. Preparar la mezcla de congelación 90% suero bovino fetal, 10% bicarbonato de sodio al 7.5% en un tubo falcon de 15 mL.
6. Para congelar las alícuotas del virus, de los 6-8 mL que resultan de una botella de 25cm², añadir 1.5 de mezcla SBF-Bicarbonato y dividir en viales de 1 mL.
7. Almacenar a -70°C.

Observaciones

- ✓ La mezcla suero bovino fetal – bicarbonato se usa para proteger las partículas virales. El pH básico les proporciona estabilidad.

8. PROTOCOLOS PARA EXTRACCIÓN DE RNA

Fundamento

Trizol (Invitrogen), es una solución monofásica de fenol e isotiocianato de guanidina, que se emplea para extracción de RNA basada en el método desarrollado por Chomczynski y Sacchi. [Anal. Biochem. 162 :156-9, 1987.]. Durante la homogenización de la muestra, el reactivo mantiene la integridad de RNA mientras lisa las células y disuelve componentes celulares. La adición de cloroformo y la posterior centrifugación, separa la mezcla en dos fases (acuosa y orgánica). El RNA se precipita añadiendo isopropanol a la fase acuosa y se recupera por centrifugación.

Material

- ✓ Microtubos de 1.5 mL. Marca Axygen. Cat. MCT-150-C.
- ✓ Microtubos de 2mL. Marca Axygen. Cat. MCT-200.
- ✓ Pipetas automáticas.

Reactivos

- ✓ TRIZol
- ✓ Cloroformo. 500mL. Sigma-Aldrich. Cat. 2432-500mL.
- ✓ Isopropanol
- ✓ Etanol al 70% en agua DEPC.
- ✓ Agua DEPC.

Equipo

- ✓ Centrifuga refrigerada
- ✓ Campana de flujo laminar.

Protocolo

1. Remover medio por aspiración de la botella o los pozos de la placa de cultivo. No hacer lavado con PBS.
2. Fase de homogenización: Adicionar 1mL. De TRIzol a una botella de 25cm² para su lisis. En el caso de hacer la extracción de RNA a un extracto viral, usar una proporción 1:1 volumen, la adición del TRIzol debe hacerse a 4°C.
3. Fase de separación: incubar durante 5 minutos a temperatura ambiente para permitir la disociación completa de los complejos de las nucleoproteínas.
4. Transferir la mezcla de TRIzol a un tubo Eppendorf de 2mL.
5. Añadir 40µL de cloroformo frío por cada 200µL de TRIzol empleados. Mezclar por inversión 15 segundos.
6. Incubar el tubo en hielo de 2 a 3 minutos.
7. Centrifugar a 13000 rpm durante 15 minutos a 4°C.
8. Fase de precipitación: recuperar la fase acuosa y adicionarle 500 µL de isopropanol frío por cada mililitro de TRIzol empleado.
9. Incubar a -80°C durante una hora o toda la noche.
10. Centrifugar a 13000 rpm durante 15 minutos a 4°C.
11. Fase de lavado: remover el sobrenadante y lavar la pastilla con 1 mL de etanol frío por cada mililitro de TRIzol empleado. Mezclar con vortex.
12. Centrifugar a 13000 rpm durante 15 minutos a 4°C
13. Fase de resuspension: retirar etanol sin tocar la pastilla con la puntilla.
14. Dar un pequeño spin a temperatura ambiente para poder eliminar los restos de etanol en el tubo con ayuda de una puntilla de 10µL.
15. Resuspender la pastilla en 20-30 µL de agua DEPC con 1 µL de inhibidor de RNAasas (RNAout o RNAsin).

9. SÍNTESIS DE cDNA (RETROTRANSCRIPCIÓN)

Fundamento

En la reacción de retrotranscripción, se sintetiza cDNA (ADN complementario) a partir del RNA por acción de la enzima retrotranscriptasa reversa. En este protocolo la enzima empleada es la MMLV (Molones Murine Leucemia Virus), obtenida de forma recombinante y purificada a partir de la E. coli. Posee actividad 5'-3' ribonucleasa H, la cual permite alongar las cadenas de cDNA hasta una longitud mayor a 7kb.

Material

- ✓ Microtubos de 0.2 mL. Marca Axygen. Cat. PCR-02-C1.

Reactivos

- ✓ Buffer RT 5X
- ✓ Random primers 0.02 mg/mL.
- ✓ DDT 0.01 M
- ✓ Dntps 10 mm
- ✓ Inhibidor de RNAsas 40 U/mL.
- ✓ Agua mili Q tratada con DEPC.

Equipo

- ✓ Pipetas automáticas
- ✓ Termociclador. Marca Applied Biosystems. Modelo GeneAmp PCR System 9700.

Protocolo

1. Colocar en un tubo Eppendorf de 0.2 mL 1µL de random primers, 3µL de RNA y 7.5µL de agua DEPC.
2. Colocar los tubos en el termociclador a 72°C durante 10 minutos.
3. Incubar la muestra en hielo durante 3 minutos.
4. Preparar la siguiente mezcla de reacción: 4 µL de buffer RT 5X, 2 µL de DTT 0.1M , 0.5 µL de inhibidor de RNAsas y 1 µL de dNTPs 10 mM.
5. Añadir 8 µL de la mezcla de reacción al tubo que se incubo en hielo, así como 1 µL de la enzima MMLV.
6. Colocar el tubo en el termociclador y continuar con el siguiente programa:
 - a) 10 minutos/25°C
 - b) 60 minutos/37°C
 - c) 5 minutos/94°C
 - d) 10 minutos/4°C
7. Terminado el programa del termociclador, retirar el tubo que contiene el cDNA y almacenarlo a -20 °C hasta su uso.

Condiciones de reacción	
Reactivo	Volumen
Buffer RT 5X	4 µL
DTT 0.1M	2 µL
RNase out	0.5 µL
dNTPs 10mM	1 µL
RT-MMLV 200U/mL	1 µL
Volumen total	8.5 µL

Programa del Termociclador		
Paso	Temperatura	Tiempo
1	72 °C	10 minutos
2	25 °C	10 minutos
3	37 °C	60 minutos
4	94 °C	5 minutos
5	4 °C	10 minutos

10. DETECCIÓN MOLECULAR DEL VIRUS DEL DENGUE

Serotipificación del virus del dengue por el protocolo Lanciotti

Fundamento

El diagnóstico de laboratorio de las infecciones por dengue incluye técnicas moleculares como la RT-PCR, para la cual se han reportado y publicado más de 16 protocolos diferentes. Sin embargo, el protocolo cuyo uso se encuentra más extendido a nivel mundial es el reportado por Lanciotti y colaboradores en 1992. El protocolo involucra un par de primers universales para los 4 serotipos del dengue (primers D1 y D2), que hibridan sobre la región C y pre-M del genoma viral. Posteriormente en una segunda ronda de amplificación, utilizando primers específicos para cada serotipo (Type Specific primers', TS: TS1, TS2, TS3 y TS4) se amplifica un fragmento con un tamaño particular para cada serotipo viral. [J. Virol. Meth. 72:27-41].

Se ha reportado que este ensayo excede la sensibilidad obtenida por amplificación viral en cultivo celular cuando se usan alícuotas de la misma muestra, y se usa ampliamente para diagnóstico y monitoreo del dengue, particularmente en países del sureste de Asia.[J. Clin. Microbiol., August 2003, p. 3864-3867, Vol. 41, No. 8]

Material

- ✓ Microtubos de 0.2mL. Marca Axygen. Cat. PCR-02-C1.

Reactivos

- ✓ Taq DNA Polymerase recombinante
- ✓ Buffer 10X para PCR sin Mg⁺²
- ✓ Cloruro de magnesio 50Mm

- ✓ Primers D1, D2, TS1 Y TS2.
- ✓ dNTPs
- ✓ Agua miliQ
- ✓ Agarosa Ultrapure. Marca Invitrogen (Carlsbad, CA, USA).

Equipo

- ✓ Termociclador. Marca Eppendorf. Modelo Masrercycler gradient.
- ✓ Cámara de electroforesis. Marca Owl. Modelo B1A.
- ✓ Fuente de poder. Marca Bio Rad. Modelo Power Pac 100.
- ✓ Horno de micro-ondas. Marca Panasonic.

Protocolo

Primera PCR, para saber si la muestra es positiva a DENV (DENV-1 – DENV-4)

1. Para la amplificación se toman 10µL de cDNA recién sintetizado y se mezcla con 40 µL de la mezcla de reacción de PCR que contiene:

Reactivo	Conc. inicial	Conc. final	Vol. µL
Agua miliQ	--		25.5
Buffer (500mM KCl 1000mM Tris – HCl, pH = 8)	10X	1X	5
MgCl ₂	50mM	1.5mM	3
dNTPs mezcla	10mM c/u	0.2µM	1
D1	10µM	0.5µM	2.5
D2	10µM	0.5µM	2.5
Taq DNA polimerasa	5U/µL	2.5 U	0.5
Volumen total			40
cDNA			10
	Vol. total		50.0

2. La reacción se realiza con un ciclo inicial de cinco minutos a 94°C, 40 ciclos de 94°C por un minuto, 60°C un minuto y 72°C dos minutos, con un ciclo final de extensión de 10 minutos a 72°C.
3. Al terminar la amplificación se retiran los tubos del termociclador y se guardan a -70°C hasta su análisis.

Segunda PCR, para saber que serotipo de dengue se encuentra en la muestra.

1. Para esta amplificación se toma 10 µM del DNA amplificado en la primera PCR, se mezclan con 40 µM de la mezcla de reacción que contiene:

Reactivo	Conc. inicial	Conc. final	Vol. µL
Agua miliQ	--		25.5
Buffer (500mM KCl 1000mM Tris – HCl, pH = 8)	10X	1X	5
MgCl ₂	50mM	1.5mM	3
dNTPs mezcla	10mM c/u	0.2µM	1
D1	10µM	0.5µM	2.5
TS1	10µM	0.5µM	2.5
TS2	10µM	0.5µM	2.5
TS3	10µM	0.5µM	2.5
TS4	10µM	0.5µM	2.5
Taq DNA polimerasa	5U/µL	2.5 U	0.5
Volumen total			40
DNA 1 ^{ra} PCR			10
	Vol. total		50.0

2. La reacción se lleva a cabo de manera similar a la primera PCR con un ciclo inicial de cinco minutos a 94°C, 40 ciclos de 94°C por un minuto, 60°C un minuto y 72°C dos minutos, con un ciclo final de extensión de 10 minutos a 72°C.
3. Para disminuir errores de pipeteo y dilución se recomienda preparar una mezcla maestra del total de los reactivos, excepto por la adición del cDNA molde y las enzimas, esta mezcla se dividirá con el total de los tubos de reacción.

Detección

Los productos amplificados se detectaron por medio de una electroforesis en gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio, en buffer TBE 1X (Tris-HCl 1M, ácido bórico 1M y EDTA 0.5mM). Además, se utilizan marcadores de pares de bases (pb) para estimar el tamaño del producto amplificado. Los geles se corrieron a 70 V.

Resultados

Las muestras que presenten las bandas de 511bp en la PCR 1 se consideran como positivas. Aquellas muestras que no presenten bandas de amplificación de ningún tamaño se consideran negativas. En la PCR 2 la banda positiva para DENV-1 debe producir un fragmento de 482pb, para DENV-2 de 119 pb, para DENV-3 290pb y para DENV-4 un tamaño de 392pb (figura 28).

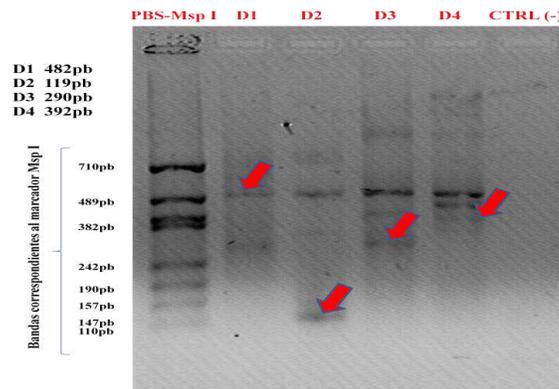


Figura 28. Gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio. Se muestra el marcador molecular, los cuatro serotipos de dengue (D1-D-4) y el control negativo. Foto por Ewry A. Zárate Nahón.