

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**  
**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**



**BIONOMÍA DEL MOSQUITO *Aedes (Stegomyia) aegypti* (L.) EN IGLESIAS Y  
CEMENTERIO DE LA CIUDAD DE MÉRIDA, YUCATÁN, MÉXICO, Y LA  
IDENTIFICACIÓN DE ARBOVIRUS**

**POR**

**M.C. CARLOS MARCIAL BAAK BAAK**

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR  
EN CIENCIAS CON ACENTUACIÓN EN ENTOMOLOGÍA MÉDICA**

**ENERO, 2018**

**BIONOMÍA DEL MOSQUITO *Aedes (Stegomyia) aegypti* (L.) EN IGLESIAS Y  
CEMENTERIO DE LA CIUDAD DE MÉRIDA, YUCATÁN, MÉXICO, Y LA  
IDENTIFICACIÓN DE ARBOVIRUS**

**Comité de Tesis**

---

**Dr. Raúl Torres Zapata**  
**Director**

---

**Dra. Violeta Ariadna Rodríguez Castro**  
**Secretario**

---

**Dr. Roberto Mercado Hernández**  
**Primer vocal**

---

**Dra. María Julia Verde Star**  
**Segundo vocal**

---

**Dr. Gustavo Ponce García**  
**Tercer vocal**

**BIONOMÍA DEL MOSQUITO *Aedes (Stegomyia) aegypti* (L.) EN  
IGLESIAS Y CEMENTERIO DE LA CIUDAD DE MÉRIDA,  
YUCATÁN, MÉXICO, Y LA IDENTIFICACIÓN DE  
ARBOVIRUS**

**Dirección de Tesis**

---

**Dr. Raúl Torres Zapata**  
**Director**

---

**Dra. Julián E. García Rejón**  
**Director externo**

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca (193257) otorgada para la realización de este posgrado.

A mis asesores Dr. Julián E. García Rejón, y Dr. Raúl Torres Zapata, por su asesoramiento y apoyo para el desarrollo de esta investigación.

A los miembros de mi comité por su orientación, sugerencias y aportaciones para la conclusión de esta tesis.

A todos los que contribuyeron con su sangre, tiempo, paciencia, compañía, enseñanzas y esfuerzo para la realización de esta investigación.

## **DEDICATORIA**

A mi esposa Nohemi, que en todo momento estuvo dándome su voto de confianza en momentos cuando la paciencia se agota. Por las charlas amenas, por las situaciones difíciles en que nos levantamos juntos.

A mi hijo Thiago, su llegada a nuestra vida renovó las ilusiones por la vida y por la ciencia.

A mis padres (Alfonsa y Justino) y mis hermanos (Jorge y Jesús), sin su ayuda moral, anímica, espiritual y todo aquello que solo en una familia se puede dar, no hubiese sido posible llegar hasta este día en mi formación profesional.

Al dr. Julián E. García Rejón, por su amistad y consejos brindados, los cuales, cimentaron mi formación personal y profesional.

A todo el laboratorio de Arbovirología de la Universidad Autónoma de Yucatán, especialmente a Lupita cruz, Cesar Tzuc, Rosi Cetina, Lula Talavera y Carlos Machain, por la ayuda técnica y por la amistad brindada a lo largo del proyecto.

Para ellos

Solo puedo decir GRACIAS

Carlos Marcial

ÍNDICE GENERAL	Página
1.INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Antecedentes .....	3
1.1.1 Epidemiología de las arbovirosis en México y Yucatán.....	3
1.1.2 El virus del dengue .....	4
1.1.3 El virus Zika.....	5
1.1.4 El virus chikungunya.....	6
1.1.5 <i>Aedes aegypti</i> : Origen, distribución y comportamiento de alimentación.....	7
1.1.6 Sitios de cría de <i>Ae. aegypti</i> por área geográfica .....	8
1.1.7 Sitios de cría de <i>Ae. aegypti</i> por temporalidad .....	9
1.1.8 Sitios de cría de <i>Ae. aegypti</i> en áreas no residenciales .....	11
1.1.9 <i>Aedes aegypti</i> infectados con el virus del dengue, chikungunya y Zika.....	12
2. JUSTIFICACIÓN .....	13
3. HIPÓTESIS .....	14
4. OBJETIVO GENERAL .....	15
4.1 Objetivos específicos .....	15
5. MATERIALES Y MÉTODOS .....	16
5.1 Sitio de estudio .....	16
5.2 Selección de los sitios de estudio .....	17
5.3 Colecta de mosquitos .....	18
5.4 Determinación del ciclo gonotrófico .....	20
5.5 Oogenesis .....	23
5.6 Preferencias alimenticias de <i>Ae. aegypti</i> colectado en iglesias .....	24
5.7 Identificación de arbovirus en <i>Ae. aegypti</i> .....	25
5.8 Cultivo celular .....	26
5.9 Análisis de datos .....	26
5.10 Análisis filogenético molecular basado en el gen NS5 .....	27
6. RESULTADOS .....	28
6.1 Abundancia de la etapa inmadura de <i>Ae. aegypti</i> y otros mosquitos en	

iglesias.....	28
6.2 Abundancia de la población adulta de <i>Ae. aegypti</i> y otros mosquitos en iglesias .....	31
6.3 Abundancia de la etapa inmadura de <i>Ae. aegypti</i> y otros mosquitos en cementerio .....	33
6.4 Abundancia de la población adulta de <i>Ae. aegypti</i> y otros mosquitos en cementerio .....	35
6.5 Ciclo gonotrófico de <i>Ae. aegypti</i> y sobrevivencia diaria en iglesias .....	37
6.6 Ciclo gonotrófico de <i>Ae. aegypti</i> y sobrevivencia diaria en el cementerio.....	37
6.7 Vitellogenesis de <i>Ae. aegypti</i> .....	38
6.8 Preferencia alimenticia de <i>Ae. aegypti</i> en iglesias .....	43
6.9 Identificación del virus dengue en iglesias y análisis filogenético.....	45
6.10 Identificación del virus dengue y Zika en el cementerio y análisis filogenético .....	47
7. DISCUSIÓN .....	49
8. CONCLUSIONES .....	56
9. LITERATURA CITADA .....	57
10. ANEXOS .....	76

## ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Genotipos de cada serotipo del virus dengue presentes en México.	7
Tabla 2. Composición de especies de mosquitos y abundancia de sus estados inmaduros en iglesias de la ciudad de Mérida, Yucatán, México .....	29
Tabla 3. Abundancia de los estados inmaduros de <i>Ae. aegypti</i> colectados en iglesias de la ciudad de Mérida, Yucatán, México .....	30
Tabla 4. Composición y abundancia de mosquitos adultos capturadas en las iglesias de la ciudad de Mérida, Yucatán, México .....	32
Tabla 5. Datos sobre recipientes examinados y la abundancia de sus estados inmaduros de <i>Ae. aegypti</i> colectados en el cementerio de la ciudad de Mérida, Yucatán, México.....	33
Tabla 6. Composición de especies de mosquitos y abundancia de sus estados inmaduros en el cementerio de la ciudad de Mérida, Yucatán, México.....	34
Tabla 7. Composición y abundancia de mosquitos adultos capturadas en el cementerio de la ciudad de Mérida, Yucatán, México.....	36
Tabla 8. Índice de paridad de <i>Ae. aegypti</i> colectado en las iglesias de la ciudad de Mérida, Yucatán, México .....	39
Tabla 9. Duración del ciclo gonotrófico de <i>Aedes aegypti</i> capturados en iglesias y cementerio de la ciudad de Mérida, Yucatán, México ...	40
Tabla 10. Índice de paridad de <i>Ae. aegypti</i> colectado en el cementerio de la ciudad de Mérida, Yucatán, México .....	41
Tabla 11. Vitellogenesis de <i>Ae. aegypti</i> en temporada de lluvias y secas, después de una alimentación sanguínea en laboratorio .....	42
Tabla 12. Preferencia alimenticia de <i>Ae. aegypti</i> mediante gen del Cyt b ..	44
Tabla 13. Identificación del virus dengue en hembras del mosquito <i>Ae. aegypti</i> colectadas en las iglesias de Mérida, Yucatán .....	45
Anexo 1 Número de acceso del virus del dengue en el GenBank .....	76
Anexo 2 Número de acceso del virus del Zika en el GenBank .....	82

Anexo 3 Distancia genética (dos parámetros de Kimura) del VDEN-1.....	85
Anexo 4 Distancia genética (dos parámetros de Kimura) de DENV-2 .....	86
Anexo 5 Alineamiento de las variantes genéticas del virus del Zika .....	87
Anexo 6. Distancia genética (dos parámetros de Kimura) del VZIK .....	87

## ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Mapa de la ciudad de Mérida, Yucatán, con los sitios de estudio	16
Figura 2. Iglesias de la ciudad de Mérida dentro del estudio .....	17
Figura 3. Cementerio general de la ciudad de Mérida, Yucatán .....	18
Figura 4. Trampa centinela usadas para la captura de mosquitos adultos en el cementerio .....	19
Figura 5. Estado de Sella o índice de digestión sanguínea .....	20
Figura 6. Ovarios de <i>Ae. aegypti</i> .....	21
Figura 7. Análisis del desarrollo del ovario por medio de los estados de Christopher's .....	23
Figura 8. Desarrollo del huevo observado bajo microscopio de luz invertida (32/0.4X) .....	42
Figura 9. Análisis de la fuente sanguínea en <i>Ae. aegypti</i> usando oligos específicos de humano (gen del Cyt b) .....	43
Figura 10. Análisis de Inferencia Bayesiana (IB) con el fragmento del gen NS5 del virus dengue .....	47

## LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

ABREVIATURAS	SIGNIFICADO
ADN	Ácido Desoxirribonucleico.
ARN	Ácido Ribonucleico.
Cyt b	Citocromo b.
NS1	Proteína No Estructural 1.
NS5	Proteína No Estructural 5.
RT-PCR	La reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa.
TMI	Tasa Mínima de Infección.
VCHIK	Virus de chikungunya.
VZIK	Virus del Zika.

## RESUMEN

*Aedes aegypti* es el vector principal de los virus dengue (VDEN), Zika (VZIK) y chikungunya (VCHIK). Aunque su bionomía es bien documentada para casas, su comportamiento es poco conocido en sitios públicos. En el presente estudio, la bionomía de *Ae. aegypti* fue descrito en iglesias y cementerio de la ciudad de Mérida, Yucatán. Los sitios de estudio fueron visitados cuatro veces por mes entre septiembre de 2015 y octubre de 2016. Los mosquitos adultos, fueron capturados con aspiradores de mochila. Las larvas y pupas fueron colectadas con la ayuda de pipetas de plástico. La duración del ciclo gonotrófico fue estimado con el análisis de correlación cruzada, basado en la paridad diaria de *Ae. aegypti* durante 25 días. La preferencia alimenticia del mosquito fue determinada con el gen del citocromo b de humanos y mamíferos. Los arbovirus fueron identificados con RT-PCR mediante la amplificación de regiones específicas de los genes de VDEN, VZIK y VCHIK. Durante todo el periodo de estudio, en las iglesias se colectaron 6,051 larvas y 315 pupas. Mientras que, en el cementerio se colectaron 8,052 larvas y 575 pupas. En cuanto los mosquitos adultos de *Ae. aegypti*, se colectaron en iglesias 1,380 hembras. De las cuales, 1,178 en la estación de lluvias y 202 en la de seca; la mayoría estaban alimentadas (615). En el cementerio se obtuvieron 1,648 hembras con 1,471 en periodo de lluvias y solo 177 en el de secas; la mayoría estaban sin alimentar (823). En ambos sitios de estudio, la duración del ciclo gonotrófico fue de cuatro días en temporada de lluvia y tres días en la temporada de secas. El 76% (223/292) de hembras de *Ae. aegypti* con alimentación reciente fueron analizadas y todas fueron identificadas con sangre de humano. En las iglesias fueron identificados dos pools de *Ae. aegypti* infectadas con el virus dengue (DEN-1 y 2). En el cementerio, un pool de *Ae. aegypti* fue infectado con dengue (DEN-1) y otro con el virus Zika. Los resultados sugieren que las iglesias y el cementerio de la ciudad de Mérida, Yucatán representan riesgo potencial en la transmisión de arbovirus.

## ABSTRACT

*Aedes aegypti* is the main vector of the dengue, Zika and chikungunya viruses. Although its bionomy is well documented in houses, their behavior is little known in public places. In the present study, the bionomy of *Ae. aegypti* was described in churches and cemetery of the Mérida city, Yucatán. Field work was undertaken from September 2015 to October 2016 and sampling was conducted four times per month. Resting mosquitoes were collected by using backpack-mounted aspirators. Nets, turkey basters, or pipettes were used to collect immatures from water-holding containers. Daily changes in the parous–nulliparous ratio was recorded for 25 days, and the gonotrophic cycle length was estimated by a time series analysis and the source of bloodmeal of *Ae. aegypti*. The host preference of *Ae. aegypti* was determined with the human and mammalian cytochrome b gene. *Aedes aegypti* females were processed for VDEN, VZIK and VCHIK identification by RT-PCR. For the entire study, 6,051 larvae and 315 pupae were collected in churches. In cemetery, 8,052 larvae and 575 pupae were collected. Of the *Ae. aegypti* adults, 1,380 females were collected in churches. Of which, 1,178 in the rainy season and 202 in the dry season; most were fed (615). In cemetery, 1,648 females were collected, with 1,471 in the rainy season and 177 in the dry season; most were unfed (823). In both study sites, the duration of the gonotrophic cycle was four and three days in rainy and dry season, respectively. For source of bloodmeal, we processed 76% (223/292) of *Ae. aegypti* females with freshly blood and all females tested were identified with human blood. In churches, two positive pools to dengue virus (DENV-1 and DENV-2) were identified. In cemetery, one pool was positive a DEN-1 and another to Zika virus. The results suggest that churches and cemetery represents potential risk of arbovirus transmission in Merida city.



# 1. INTRODUCCIÓN

*Aedes (Stegomyia) aegypti* L. es el vector principal del virus del dengue (VDEN), Zika (VZIK), chikungunya (VCHIK) y fiebre amarilla (Weaver y Barrett 2004). También es capaz de transmitir el virus Mayaro (Muñoz y Navarro 2012). Los virus mencionados anteriormente, causan gran morbilidad y a veces mortalidad entre los humanos que viven en áreas tropicales y sub tropicales. Los tres primeros, son causantes de enfermedades entre la población de México (García-Rejón et al. 2008; Cigarroa-Toledo et al. 2016; Guerbois et al. 2016). Actualmente, no ocurre circulación activa del virus de la fiebre amarilla. En 1923, se registró el último caso urbano de fiebre amarilla en Veracruz y el último reporte del ciclo selvático fue en 1959, en las selvas del Sureste de México (de Alba-García y Salcedo-Rocha 2002). Por consiguiente, es posible su re-emergencia, dado que tenemos al vector *Ae. aegypti* y hay flujo constante de personas desde Sudamérica, donde ocurre la transmisión activa del virus (PAHO 2017). Previamente, dos pacientes mexicanos con diagnóstico probable de dengue hemorrágico dieron positivos a IgM del virus Mayaro (Navarrete-Espinosa y Gómez-Dantés 2006). Aunque fue un caso aislado, llama la atención porque los pacientes provenían de las ciudades portuarias de Tampico, Tamaulipas y Coatzacoalcos, Veracruz. El flujo de personas, podría favorecer un patrón similar de diseminación del virus Mayaro como sucedió antes con chikungunya y Zika (Guerbois et al. 2016).

Por otra parte, la vacuna contra el dengue (Dengvaxia®, Sanofi Pasteur) fue puesto a disposición comercial desde 2015. La cual, tiene una eficacia promedio de 65% y solo es recomendable entre la población de 14 y 45 años de edad. Dicha vacuna, aún no está disponible en los servicios de salud. Aunado a esto, no existe vacunas contra el virus chikungunya y Zika. Por consiguiente, la mejor prevención costo- efectiva para la interrupción de los ciclos de transmisión de los virus es el control de *Ae. aegypti* (WHO 2009).

La efectividad de *Ae. aegypti* como vector se debe a la estrecha relación que mantiene con los humanos y a la facilidad para adquirir y diseminar los virus (Kyle y Harris 2008). Las hembras se alimentan principalmente del humano y reposan dentro de las casas (García-Rejón et al. 2008). La infección del mosquito comienza cuando las

hembras succionan sangre virémica a partir de un huésped humano o adquieren el virus por transmisión trans ovárica (Martínez et al. 2014). Después de sobrevivir un periodo de incubación extrínseca de 7-14 días, los vectores se convierten en infecciosos y pueden transmitir el virus por la picadura (Watts et al. 1987). A pesar de los métodos y estrategias de control contra los mosquitos, la incidencia de las enfermedades asociadas a arbovirus no disminuyen. Por lo tanto, es importante extender la evaluación de la bionomía de *Ae. aegypti* en sitios públicos, como iglesias y cementerios.

Las iglesias y cementerios son importantes para la cultura latinoamericana. Son sitios donde ocurre aglomeración y flujo de personas. Usualmente están ubicadas dentro de la mancha urbana y rodeadas por casas. Previamente, fue reportado que las áreas no residenciales contribuyen sustancialmente en la producción de larvas y pupas de *Ae. aegypti* (Baak-Baak et al. 2014b; Olano et al. 2015). Además, en escuelas de la ciudad de Mérida, Yucatán, fueron colectadas hembras de *Ae. aegypti* infectadas con el virus dengue (García-Rejón et al. 2011b). Por lo tanto, es razonable pensar que las iglesias y los cementerios son sitios que albergan mosquitos y con potencial para que ocurra circulación de arbovirus.

La distribución del dengue, Zika y chikungunya están estrechamente relacionada con la presencia de *Ae. aegypti*. Después de la eclosión del huevo, la sobrevivencia de los estados inmaduros de *Ae. aegypti* dependen del clima (lluvia, temperatura), la disponibilidad de alimento, la competencia intra e inter específica, las características del contenedor y la tolerancia a factores físico-químicos (temperatura, salinidad, pH) (Rueda et al. 1990; Merritt et al. 1992; Costa et al. 2008; Murrell y Juliano 2008, Barrera et al. 2011; Ramasamy et al. 2011). A su vez, la abundancia de los vectores está determinada por la emergencia de nuevos adultos y a la presencia de las formas inmaduras (Christophers 1960). Aunado a esto, *Ae. aegypti* deposita los huevos en varios recipientes para asegurar el éxito reproductivo y son capaces de resistir la desecación y mantenerse viables hasta por un año (Nelson 1986; Apostol et al. 1994). Por esta razón, es importante realizar la vigilancia entomológica dentro del entorno urbano; incluyendo los sitios públicos.

## **1.1 Antecedentes**

### **1.1.1 Epidemiología de las arbovirosis en México y Yucatán**

Los virus chikungunya y Zika fueron reportados por primera vez en México en el 2014 y 2015, respectivamente (Kautz et al. 2015; Guerbois et al. 2016). Antes de su introducción, el dengue fue la enfermedad viral más importante en México. En nuestro país, *Ae. aegypti* es el único vector comprobado de los virus mencionados anteriormente. Sin embargo, en Tamaulipas fueron identificados machos de *Aedes albopictus* Skuse infectados con el VDEN (Ibáñez-Bernal et al. 1997) y en San Luis Potosí fue hallado hembras de la misma especie infectados con VZIK (Huerta et al. 2017). A pesar de estos reportes, su significado epidemiológico aun es incierto. En México, cada año ocurren aproximadamente 139,000 infecciones por dengue, de los cuales, 119 manifiestan episodios fatales (Undurraga et al. 2015). Por otra parte, de acuerdo al sistema nacional de vigilancia epidemiológica, entre el 2014 y 2016 fueron reportados 12,417 casos de chikungunya. Mientras que, en el 2015 y 2016, fueron reportados 7,575 casos de Zika. Mediante un análisis retrospectivo sobre dengue (2000 al 2011), se determinó que México presenta diferentes grados de transmisión del virus, que van de áreas epidémicas, endémicas a hiper-endémicas (Dantes et al. 2014). Además, se determinó que el 50% de los casos de dengue se concentraron en municipios ubicados en áreas costeras y tropicales. Durante este periodo, las instituciones de salud reportaron 316,000 casos de fiebre por dengue a nivel nacional, con picos observados en 2002, 2007 y 2009. De manera dramática, la incidencia del dengue se incrementó de 1.72 por 100,000 habitantes en 2000 a 14.12 en 2011, con un pico de 112 en 2009. Similarmente, se observó que la proporción de casos severos se incrementó de 5% en 2000 a 41% en 2011. Para combatir el dengue, el sector salud de México gasta aproximadamente 170 millones de dólares anuales para el control del mosquito vector y en atención a los pacientes infectados con el virus dengue (Undurraga et al. 2015). Es probable que, con la circulación simultánea del dengue, chikungunya y Zika, la carga económica del sector salud se incremente dramáticamente.

Desafortunadamente, el estado de Yucatán ha estado involucrado en la historia nacional del dengue. Las primeras epidemias se presentaron en el estado en 1979-1982 (DEN-1), 1984 (DEN-1 y DEN-4), 1991 (DEN-2 y DEN-4), 1994 (DEN-1, DEN-2 y DEN-4) y 1995-1997 (los cuatro serotipos) (Loroño-Pino et al. 1993). La última epidemia del dengue ocurrió en el 2011, en el que se reportaron casos severos y fallecimientos asociados con el virus (Dantes et al. 2014). Cabe destacar que, en Yucatán, el virus dengue ha sido identificado tanto en humanos como en hembras de *Ae. aegypti* (Loroño-Pino et al. 1993; García-Rejón et al. 2008). Mientras tanto, el virus chikungunya y Zika fueron reportados por primera vez en Yucatán en 2015 y 2016, respectivamente. Ambos virus han sido identificados en humanos, pero solo el virus chikungunya ha sido identificado tanto en el vector como en los humanos (Cigarroa-Toledo et al. 2016).

### **1.1.2 El virus del dengue**

El VDEN pertenece al género *Flavivirus* y a la familia *Flaviviridae* (Kyle y Harris 2008). Presenta un genoma de ARN de cadena positiva y una membrana de naturaleza lipídica, que envuelve completamente al virión. El virus es circular, mide entre 40 a 50 nm de diámetro y presenta una envoltura de lipopolisacáridos (Guzmán et al. 2010). El genoma del virión mide aproximadamente 11 kb de longitud. Tiene un único marco de lectura abierto que codifica tres proteínas estructurales – proteína de la cápside (C), proteína asociada a la membrana (M), y proteína de la envoltura (E), y proteínas no estructurales –NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B y NS5) (Chambers et al. 1990).

Existen cuatro serotipos del VDEN (VDEN-1 a VDEN-4) que infectan a los humanos y son transmitidos principalmente por hembras de *Ae. aegypti*. Sin embargo, en el 2013 fue reportado un quinto serotipo (VDEN-5). Este fue identificado en una muestra de sangre de un agricultor ingresado en un hospital de Malasia en 2007 (Normile 2013). El VDEN-5 se mantiene entre primates y mosquitos en ciclos selváticos (Mustafa et al. 2015). Aun es desconocido su implicación epidemiológica. Los primeros cuatro serotipos (VDEN-1 a 4) comparten el 65% de su genoma. Aunque son diferentes antigénicamente, causan síntomas clínicos similares en los humanos (Guzmán et al.

2010). Con base en el análisis de la secuencia completa del gen E de la envoltura, fue posible identificar genotipos en cada serotipo del dengue. En México circulan los cuatro serotipos. El VDEN-1 fue identificado en 1978, seguido por el VDEN-2 en 1981, el VDEN-4 en 1982 y finalmente el VDEN-3 en 1995 (Kyle y Harris 2008; Carrillo-Valenzo et al. 2010). Carrillo-Valenzo y colaboradores (2010) analizaron secuencias completas del gen E de cada serotipo del VDEN en un periodo de 27 años. Las secuencias provenían de estados endémicos de dengue en México. El análisis filogenético demostró que los genotipos de cada serotipo tuvieron múltiples introducciones, ocurriendo reemplazamientos a lo largo del tiempo desde su aparición en México en 1978 (Tabla 1).

### **1.1.3 El virus Zika**

Es un virus con genoma de ARN monocatenario de polaridad positiva, con cápside icosaédrica y no segmentado. Pertenece al género *Flavivirus* y a la familia *Flaviviridae*. El genoma completo tiene 10,794 nucleótidos que codifican 3,419 aminoácidos (Cunha et al. 2016). EL virus fue identificado por primera vez en 1947, en la sangre de un mono Rhesus (*Macaca mulatta*) procedente de un bosque denominado Zika en Uganda, África. El descubrimiento ocurrió mientras se investigaba a la enfermedad de la fiebre amarilla (Dick et al. 1952). Posteriormente, en 1952 se detectó la infección en seres humanos a través de estudios serológicos (Uganda y República Unida de Tanzania), pero fue hasta 1968 cuando se logró aislar el virus a partir de muestras humanas en Nigeria (Macnamara 1954). En mosquitos fue identificado por primera vez en *Aedes africanus* en 1963 (Haddow et al. 1964).

El virus Zika fue reportado por primera vez en América en el 2014. Un habitante de la Isla de Pascua, había viajado a una feria de arte en Tahití (Polinesia Francesa), a su regreso, presentó un cuadro febril y el análisis enviado a Santiago de Chile, confirmó el diagnóstico de Zika. Posteriormente, el Zika llegó a Brasil (Zanluca et al. 2015) y se cree que de allí se dispersó a la mayoría de los países del continente. En México, el primer caso de VZIK importado ocurrió en octubre de 2015, cuando un habitante del estado de Querétaro retornó de Colombia infectado con el virus (Díaz-Quíñonez et al. 2016). En el siguiente mes de noviembre, fueron reportados los dos primeros casos

autóctonos de infección por el virus Zika; uno fue en Monterrey y otro en Chiapas (Corona et al. 2016). Han sido identificado tres linajes del virus: el africano oriental, el africano occidental y el asiático (Simonin et al. 2017). La anterior subdivisión está basada en las secuencias completas del virus. En México y América, circula el linaje asiático, el cual, ha provocado los brotes asociados al virus (Wang et al. 2016). Ha sido estimado que el 80% de los casos son asintomáticos. Sin embargo, el cuadro clínico más común son fiebre, conjuntivitis, rash y dolor de cabeza. Entre los cuadros severos se ha observado que causan un síndrome congénito en bebés y el síndrome de Guillain-Barré. El virus también puede transmitirse por vía sexual (Patterson et al. 2016).

#### **1.1.4 El virus chikungunya**

Es un virus con genoma de ARN monocatenario de polaridad positiva. El ARN genómico es en sí mismo ARN mensajero. Pertenece al género *Alfavirus* y a la familia *Togaviridae*. El virus mide 70nm de diámetro y tiene una cápside icosaédrica con envoltura. El genoma completo tiene aproximadamente 11,800 nucleótidos de longitud, el cual, codifica cinco proteínas estructurales que componen la partícula viral madura (C, E3, E2, 6K, y E1). También codifica para cuatro proteínas no estructurales (nsP1, nsP2, nsP3 y nsP4) implicadas en la replicación viral (Khan et al. 2002, Figueiredo y Figueiredo 2014). Han sido identificados cuatro linajes del virus: ECSA (Este, Central y Sur África), África Occidental, Océano Índico, y asiático. La subdivisión anterior está basada en las secuencias de genes de la glicoproteína E1 y E2 de la envoltura (Weaver y Forrester 2015).

El virus chikungunya, causante de la fiebre del mismo nombre, se caracteriza por producir fiebres altas, artralgia y exantema en los pacientes. El virus fue aislado por primera vez en 1952 en Tanzania, África, a partir de un primate. A principio, generó brotes esporádicos en humanos y posteriormente, se dispersó a algunos países de Asia (Robinson 1955). El nombre del virus deriva del makonde, lengua bantú hablada en Tanzania y Mozambique. Significa “el hombre que camina encorvado”, en alusión al dolor articular provocado por la infección. En América, los primeros brotes de la enfermedad fueron causados por el genotipo asiático. Este virus se introdujo en América a través del Caribe, y los primeros casos autóctonos fueron reportados en Saint Martin y

las Antillas francesas en diciembre de 2013 (Fischer y Staples 2014). En México, el primer caso importado ocurrió en mayo de 2014, de una mujer de 39 años que retornó de la isla caribeña Antigua y Barbuda (Rivera-Ávila 2014). Poco tiempo después, en octubre del mismo año, se presentaron los primeros casos autóctonos en Chiapas (Kautz et al. 2015). Recientemente fue reportado el linaje ECSA en Brasil (Teixeira et al. 2015), por lo tanto, es posible un nuevo brote de la enfermedad en el continente.

Tabla 1. Genotipos de cada serotipo del virus dengue presentes en México

Serotipos	Linajes o Genotipos	Genotipos presentes en México	Genotipos presentes por estado de México
V DEN-1	I-V, selvático	Genotipo III	Sonora, Sinaloa, Tamaulipas, Jalisco, Querétaro, Michoacán, Morelos, Veracruz, Tabasco, Oaxaca, Chiapas y Quintana Roo.
V DEN-2	selvático, americano, cosmopolita, asiático 1, asiático 2, y asiático-americano	Americano, cosmopolita y asiático-americano	Yucatán, Oaxaca, Sonora, Coahuila, Nuevo León, Tamaulipas, Baja California Sur, Sinaloa, Durango, Hidalgo, Estado de México, Morelos, Veracruz y Chiapas
V DEN-3	I-IV	Genotipo III	Veracruz, Baja California Sur, Morelos
V DEN-4	I-II, selvático	Genotipo II	Tabasco

### 1.1.5 *Aedes aegypti*: Origen, distribución y comportamiento de alimentación

El mosquito *Ae. aegypti* es originario de África, se cree que se distribuyó en todo el mundo a través de barriles de agua en los viajes de exploración y colonización de los europeos (Nelson 1986). Actualmente son reconocidas dos subespecies de *Ae. aegypti sensu lato*. La forma ancestral llamado *Ae. aegypti formosus*, el cual, es un mosquito selvático presente en el área subsahariana de África. La otra subespecie es *Ae. aegypti aegypti*, cuya distribución es cosmopolita en las áreas sub tropicales y tropicales, con hábitos domésticos (Moore et al. 2013). También existe una variedad del mosquito, llamado *Ae. aegypti queenslandensis* (Nelson 1986).

*Aedes aegypti* es un mosquito antropofílico, deposita sus huevos en recipientes con agua cerca de las casas y alrededor de ellas (García-Rejón et al. 2011a; Arana-Guardia et al. 2014; Baak-Baak et al. 2014a). Los adultos reposan dentro de las casas, principalmente en las recamaras (García-Rejón et al. 2008). En su comportamiento de alimentación presenta tres patrones importantes, comprendido entre las 0700, 1100 y 1700 horas (Chadee y Martínez 2000). Estudios previos reportaron que más del 96% se alimentan del humano (Scott et al. 2000). En adición, fue reportado que el 88% de la sangre encontrada en el mosquito proviene de un solo huésped (humano) y solo el 7% presentaron alimentaciones múltiples (Scott et al. 1993). También fue determinado que las hembras de *Ae. aegypti* ingieren entre 1.3 a 6.6 µl de sangre en cada alimentación y ponen entre 18 a 116 huevos (Briegel 1990). La duración del ciclo gonotrófico es un parámetro importante en la epidemiología del dengue, porque determina la frecuencia con que la hembra de *Ae. aegypti* se alimentan de sangre. Estudios previos reportaron que entre cada alimentación sanguínea y postura de huevos pasan entre 3 y 7 días (Morrison et al. 1999; Wong et al. 2011). Interesantemente, fue reportado que la probabilidad de que un humano sea picado por la hembra de *Ae. aegypti* en el hogar está relacionado al tiempo que permanece en ella (Liebman et al. 2014). Esto nos lleva a la necesidad de preguntarnos, cuál es la probabilidad de que los niños en las escuelas, y la gente en las iglesias, templos y en los hospitales sean picados por *Ae. aegypti*, ya que permanecen muchas horas en esos sitios.

#### **1.1.6 Sitios de cría de *Ae. aegypti* por área geográfica**

La importancia de los contenedores artificiales como criaderos de *Ae. aegypti* varía en diversas regiones del mundo. En países de Asia, los criaderos más comunes son los inodoros en desuso, los tanques de cemento y los barriles (Tsuzuki et al. 2009; Dieng et al. 2012; Wai et al. 2012). En el norte de Australia, encontraron que una cantidad significativa de tanques sustentaron la población de *Ae. aegypti* en el área rural. Mientras que, en la ciudad donde hay pocos tanques, la mayoría de los sitios de crianza fueron las bases de las macetas (Barker-Hudson et al. 1988). Otro estudio importante realizado en el mismo país, destacó la importancia de los hábitats larvales subterráneos. Entre los cuales, se identificó a los pozos de registro, las fosas, los tanques sépticos y desagües

pluviales (Kay et al. 2000). En América, ha sido identificado una gran diversidad de criaderos. En Brasil, las llantas y los recipientes desechables fueron los sitios ideales de reproducción de *Ae. aegypti* (Lopes et al. 1993; Mazine et al. 1996; Favier et al. 2006; Glasser et al. 2011; Mendonca et al. 2011). Mientras que, en Costa Rica fueron los electrodomésticos sin uso y los recipientes desechables (Trovo et al. 2008). En Argentina, fueron reportados los recipientes desechables, las macetas y los tanques (Rubio et al. 2011, Costa et al. 2012). Además, en el mismo país, fueron identificadas larvas y pupas de *Ae. aegypti* en huecos de árboles localizados en calles y lugares públicos (Mangudo et al. 2011). En Puerto Rico, con base en diferentes estudios se logró identificar criaderos comunes como las llantas, los recipientes desechables y las cubetas (Moore et al. 1978; Barrera et al. 2006a, b). Entre los criaderos inusuales de *Ae. aegypti*, se identificaron los tanques sépticos y los medidores de agua (water meter) (Barrera et al. 2008; Burke et al. 2010; Barrera et al. 2011). Mientras que, en el Caribe, los criaderos más productivos fueron los tambores, tinas, lavabos y cubetas (Chadee 2004). En México, los criaderos principales son los recipientes desechables, las cubetas, las macetas, los tanques de cemento y las llantas (Lloyd et al. 1992; Winch et al. 1992; Arredondo-Jiménez y Valdez-Delgado 2006; Manrique-Saide et al. 2008; García-Rejón et al. 2011a; Villegas-Trejo et al. 2011). En la ciudad de Mérida, además de los criaderos mencionados anteriormente, también están reportadas las alcantarillas como criaderos productivos. Muchos de estos hábitats larvales, están ubicados cerca de las casas, los mercados, las escuelas y los hospitales (Manrique-Saide et al. 2012, 2013; Arana-Guardia et al. 2014).

### **1.1.7 Sitios de cría de *Ae. aegypti* por temporalidad**

La temporalidad es un factor muy importante a considerar, cuando se realizan estudios sobre la abundancia de *Ae. aegypti* y su implicación en la transmisión de arbovirus (García-Rejón et al. 2011a). Estudios recientes, enfatizan la vigilancia de las etapas inmaduros mediante la productividad pupal porque es el mejor indicador de la emergencia de los adultos (Focks y Chadee 1997; Knox et al. 2010). En diferentes estudios, se documentó que, en temporada de secas, las hembras de *Ae. aegypti* utilizan como criaderos a los recipientes donde la gente almacenan agua en sus viviendas. Esto

se constató en estudios realizados en países de Asia (Tsuzuki et al. 2009; Wai et al. 2012) y América (Chadee 2004; Arredondo-Jiménez y Valdez-Delgado 2006; Villegas-Trejo et al. 2011). Troyo y colaboradores (2011) reportaron también a los recipientes donde beben agua los animales como fuente importante de pupas de *Ae. aegypti* en temporada de secas. En la ciudad de Mérida, Yucatán, durante la temporada de secas, los criaderos más importantes fueron los recipientes no desechables (macetas, cubetas), los cuales, son abastecidos de agua por la acción humana (García-Rejón et al. 2011a). Además, las alcantarillas contribuyen enormemente con la abundancia de pupas y emergencia de adultos de *Ae. aegypti* (Manrique-Saide et al. 2013; Arana-Guardia et al. 2014).

Por otra parte, diferentes estudios han asociado a la lluvia con el aumento de las poblaciones de *Ae. aegypti* y los casos de dengue (Barrera et al. 2011; Wai et al. 2012; Bhatt et al. 2013). Durante esta temporada, el agua de los recipientes es abastecidos principalmente por la lluvia. Por consiguiente, una gran proporción de recipientes localizados en el peri domicilio se convierten en criaderos potenciales. Previos estudios realizados en temporada de lluvia, identificaron a los recipientes desechables (envases de refresco, latas, bolsas de plástico), las macetas, las llantas y las cubetas como fuente importante de estados inmaduros de *Ae. aegypti* (Mazine et al. 1996; Manrique-Saide et al. 2008; Troyo et al. 2008; Vezzani y Albicocco 2009; García-Rejón et al. 2011a; Mendonca et al. 2011; Villegas-Trejo et al. 2011). En adición, los recipientes artificiales y los floreros localizados en los cementerios, se convierten en un problema de salud pública porque se infestan de estados inmaduros de *Ae. aegypti* durante la temporada de lluvia (Abe et al. 2005, Leisnham y Juliano 2009). La importancia de la temporalidad sobre las poblaciones de *Ae. aegypti*, también ha sido demostrado con estudios en los que se usaron trampas de colecta (ovitrampas). Durante la temporada de lluvia, fue mayor el número de huevos y adultos colectados (García-Rejón et al. 2008; Dos Reis et al. 2010; Barrera et al. 2011).

### **1.1.8 Sitios de cría de *Ae. aegypti* en áreas no residenciales**

Históricamente, la vigilancia de los criaderos de *Ae. aegypti* se enfocaron en las casas. Sin embargo, en los últimos años los entomólogos han dirigido su atención en todo el ambiente urbano. Entre los lugares monitoreados están los aeropuertos, cementerios, áreas comerciales, áreas industriales, estacionamientos públicos, escuelas y terrenos baldíos (Vezzani y Schweigmann 2002; Abe et al. 2005; Morrison et al. 2006; Leishnam y Juliano 2009; Dos Reis et al. 2010; Mendonca et al. 2011; Costa et al. 2012). Con el interés de conocer los hábitats larvales de *Ae. aegypti*, diferentes estudios han demostrado la capacidad de dispersión del mosquito. Los cuales, asociaron la presencia de criaderos de *Ae. aegypti* con áreas de gran urbanización y la presencia de humanos (Braks et al. 2003; Cox et al. 2007; Tsuzuki et al. 2009). Sin embargo, hay evidencia de que *Ae. aegypti* es capaz de habitar sitios que han sido modificados por el hombre y las áreas rurales (García-Rejón et al. 2012; Brown et al. 2013; Thongsripong et al. 2013). Por consiguiente, es importante realizar vigilancia entomológica en todo el ambiente urbano.

La ciudad de Mérida, Yucatán, es un área endémica al VDENV, con brotes importantes en los últimos años. Actualmente, circulan también el VCHIK y VZIK. Los casos febriles asociados a estos virus y la presencia del vector *Ae. aegypti*, ocurren en todo el año, pero con picos importantes durante la temporada de lluvia (Loroño-Pino et al. 1993; García-Rejón et al. 2008; Eisen et al. 2014; Cigarroa-Toledo et al. 2016). Debido a que, la dispersión de las hembras grávidas de *Ae. aegypti* está relacionado a disponibilidad de los sitios de cría (Edman et al. 1998), durante las campañas realizadas para eliminar al vector, los criaderos disminuyen en el ambiente doméstico y por lo tanto *Ae. aegypti* explota nuevos hábitats larvales en nuevas áreas. Previamente, se destacó la importancia de los sitios no residenciales como fuente de reproducción de *Ae. aegypti* (Vezzani y Schweigmann 2002; Abe et al. 2005; Morrison et al. 2006; Dos Reis et al. 2010; Mendonca et al. 2011; Costa et al. 2012). Sin embargo, se requiere realizar estudios sistemáticos en estas áreas para estimar la abundancia relativa del vector entre temporadas de lluvia y de secas, así como la identificación de virus.

En un estudio realizado en Mérida, Yucatán, se comparó la productividad de los estados inmaduros de *Ae. aegypti* entre áreas residenciales y no residenciales (Baak-Baak et al. 2014). Los sitios estudiados fueron las casas, terrenos baldíos, las calles y los estacionamientos públicos. Se encontró que el índice de infestación y el total de inmaduros de *Ae. aegypti* fue mayor en los terrenos baldíos comparado con las casas. Desafortunadamente, en el estudio no se estimó la abundancia relativa de la población adulta. Otro estudio, determinó que las alcantarillas son fuente de producción de *Ae. aegypti*, capaces de mantener grandes poblaciones del vector durante todo el año (Arana-Guardia et al. 2014),

### **1.1.9 *Aedes aegypti* infectados con el virus del dengue, chikungunya y Zika**

Es reconocido que la transmisión de los arbovirus (VDEN, VCHIK y VZIK) ocurre principalmente en el ambiente doméstico. Por consiguiente, los estudios sobre identificación y aislamiento del virus han sido realizados en su mayoría en casas (Pinheiro et al. 2005; Urdaneta et al. 2005; Méndez et al. 2006; Figueiredo et al. 2013). En México, diferentes estudios han identificado el virus del dengue en hembras de *Ae. aegypti*, como ocurrió en el estado de Chihuahua (de la Mora-Covarrubias et al. 2010). Mientras que, en Guerrero, fue reportado la transmisión vertical del VDEN en *Ae. aegypti* (Dzul-Manzanilla et al. 2015). El VCHIK y VZIK fueron reportados por primera vez en *Ae. aegypti* colectados en casas de Chiapas (Diaz-González et al. 2015; Guerbois et al. 2016). Recientemente, en San Luis Potosí fue reportado a *Ae. aegypti* y *Ae. albopictus* infectados con VZIK (Huerta et al. 2017). En Mérida, Yucatán, diferentes estudios identificaron el VDEN en humanos y *Ae. aegypti* (García-Rejón et al. 2008; Loroño-Pino et al. 2013; Eisen et al. 2014). Así como, el VCHIK en el vector y en los humanos (Cigarroa-Toledo et al. 2016). En México, solamente existen dos estudios realizado en sitios públicos, donde han sido encontrado arbovirus en el vector. El primero fue realizado en escuelas, en el cual, se identificó hembras de *Ae. aegypti* infectados con el VDEN (García-Rejón et al. 2011b). En otro estudio realizado en cementerio, fue reportado a *Ae. aegypti* infectado con VZIK (Huerta et al. 2017). Por lo tanto, se necesitan más estudios para aclarar el riesgo potencial que representan sitios públicos durante la circulación de los arbovirus.

## 2. JUSTIFICACIÓN

En Yucatán, ocurre transmisión activa de los virus del dengue, chikungunya y Zika. La mayoría de los casos se presentan en Mérida, la cual, es la ciudad más grande y poblada del estado. Entre los virus mencionados anteriormente, solo existe vacuna contra los cuatro serotipos del dengue. Por consiguiente, la mejor estrategia para interrumpir la transmisión de los arbovirus es mediante la prevención y control de *Ae. aegypti*.

A pesar de existir campañas de salud dirigidas a la eliminación de los criaderos y la población adulta de *Ae. aegypti*; las enfermedades asociadas a este vector no disminuyen. Aunque la medida es efectiva para controlar las poblaciones de vectores en las casas, es probable que, criaderos de los sitios públicos estén involucrados en la reproducción de mosquitos y sean los que re-infestan las casas. Por esta razón, es importante realizar la vigilancia entomológica de *Ae. aegypti* en todo el ambiente urbano. En la ciudad de Mérida, los sitios públicos como iglesias y cementerios son de especial interés para el estudiar la bionomía de *Ae. aegypti*, porque se encuentran circundados por áreas residenciales y parques. Además, aproximadamente el 70% de los humanos infectados por el VDEN y VZIK son asintomáticos. Por lo tanto, es importante realizar la vigilancia de los virus en el vector porque podría haber una circulación no identificada en los lugares públicos.

De acuerdo a datos de la Conferencia del Episcopado Mexicano (<http://www.cem.org.mx/>), en México hay 7,739 iglesias católicas. En Yucatán están registrados 143 iglesias, de los cuales, 78 se encuentran en la ciudad de Mérida. Así mismo, de acuerdo a datos del H. Ayuntamiento de Mérida, en la ciudad hay cinco cementerios, inmersos dentro de la mancha urbana. En ambos sitios, comúnmente hay congregación y flujo de personas diariamente. Dado que, los mosquitos se distribuyen por todo el paisaje urbano, es razonable pensar que los sitios públicos albergan a *Ae. aegypti* y las personas son su fuente de alimentación. Por lo cual, existe el riesgo potencial de transmisión de arbovirus.

La información generada permitirá comprender el papel ecológico y epidemiológico de *Ae. aegypti* en iglesias y cementerios y permitirá diseñar estrategias para evitar futuros brotes de enfermedades causadas por arbovirus.

### **3. HIPÓTESIS**

La disponibilidad de criaderos de larvas y pupas de *Ae. aegypti* en iglesias y cementerios favorecen la generación de poblaciones adultas del vector. Así mismo, la congregación y el flujo habitual de la gente en estos sitios permiten la interacción con los mosquitos y la transmisión de arbovirus como dengue, chikungunya y Zika.

## **4. OBJETIVO GENERAL**

Describir la bionomía del mosquito *Ae. aegypti* en iglesias y cementerio en la ciudad de Mérida, Yucatán, entre temporada de lluvia y secas. Así como, identificar arbovirus en el mosquito.

### **4.1 Objetivos específicos**

1. Determinar la abundancia de los estados inmaduros de *Ae. aegypti* entre temporada de lluvia y secas.
2. Determinar la abundancia de la población adulta de *Ae. aegypti* entre temporada de lluvia y secas.
3. Determinar el ciclo gonotrófico de *Ae. aegypti* entre temporada de lluvia y secas.
4. Determinar las preferencias alimenticias de las hembras de *Ae. aegypti* colectadas en iglesias.
5. Identificar arbovirus en las hembras de *Ae. aegypti* entre temporada de lluvia y secas.

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1. Sitio de estudio

El estudio se llevó a cabo en la ciudad de Mérida, Yucatán, México ( $20^{\circ} 58' 12''$  N,  $89^{\circ} 37' 12''$  W), localizado en el noreste del estado de Yucatán. De acuerdo con los datos del Instituto Nacional de Estadística y Geografía del año 2015, el número de habitantes de la ciudad es de 892,363. Es decir, el 42.55% ( $892,363 / 2\,097,175$ ) de la población de Yucatán viven en Mérida. El clima de Yucatán es cálido y subhúmedo durante todo el año, y presenta dos temporadas climáticas bien marcadas. La temporada de lluvia abarca los meses de mayo a octubre, en el cual, la temperatura media mensual es de  $27.54^{\circ}\text{C}$  y con precipitación media de 1,000 mm. Mientras que, la temporada de secas abarca los meses de noviembre a abril, en el cual, la temperatura media mensual es de  $25.14^{\circ}\text{C}$  y con precipitación media de 300 mm (disponible en: <http://www.cuentame.inegi.org.mx/monografias/informacion/yuc/poblacion/default.aspx?tema=me&e=31>, consultado el 30 de octubre de 2017).

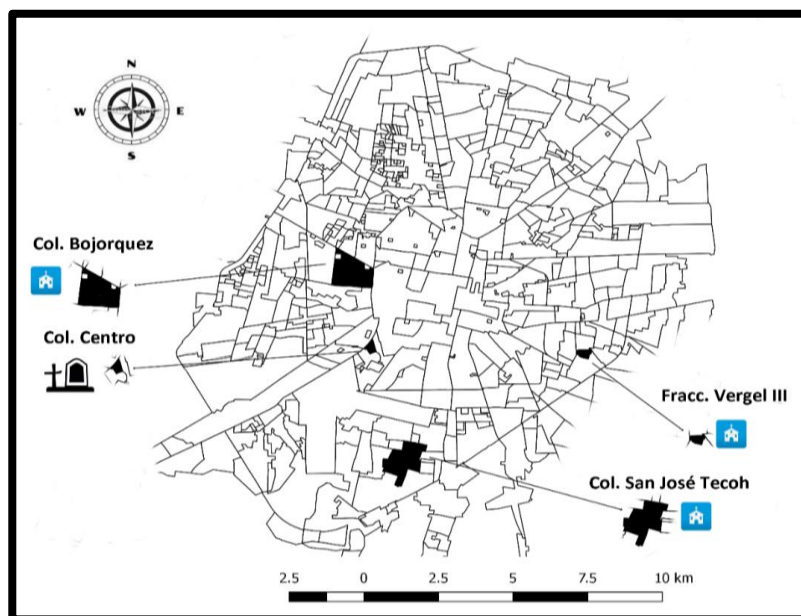


Figura 1. Mapa de la ciudad de Mérida, Yucatán, con los sitios de estudio. Las iglesias incluidas en el estudio están ubicadas en Colonia Bojórquez (centro), colonia San José Tecoh (sur) y Fraccionamiento Vergel III (este). “El cementerio General” está ubicado en el centro de la ciudad.

## 5.2. Selección de los sitios de estudio

El cementerio (n = 1) y las iglesias (n = 3) están ubicados en áreas de la ciudad de Mérida, donde históricamente han sido reportados casos de dengue y altas poblaciones de *Ae. aegypti* (García-Rejón et al. 2008, 2011b; Baak-Baak et al. 2014a; Cigarroa-Toledo et al. 2016). La distancia entre cada sitio de estudio fue de 8 y 10 km (Figura 1). El tipo de estudio fue longitudinal (abarcando la temporada de lluvia y secas) y las colectas de los mosquitos fue realizado de manera sistemática. Las tres iglesias son similares en tamaño (aproximadamente 10,000 m<sup>2</sup>), están ubicados cerca de mercados y parques recreativos. Además, están conformados por oficinas, baños, bodegas, salones, cocinas, habitaciones y grandes jardines. “El cementerio General” donde se llevó a cabo el estudio, es el más grande y antiguo de la ciudad. Por lo tanto, quedo enclavado dentro de la ciudad y alrededor de ella hay casas cercanas. De acuerdo a datos del H. Ayuntamiento de Mérida, el cementerio tiene un área de 15 hectáreas, en el cual, hay 25,700 bóvedas entre tumbas, nichos y mausoleos.

La colecta de mosquitos fue realizada durante año, entre noviembre de 2015 y octubre de 2016. En las iglesias, la colecta de los mosquitos fue realizado cuatro veces al mes (Figura 2). Mientras que, en el cementerio, la colecta fue realizado tres veces cada dos meses (Figura 3).



Figura 2. Iglesias de la ciudad de Mérida dentro del estudio. La iglesia de vergel III es de arquitectura moderna. Las iglesias de las colonias San José Tecoh y Borjórquez son de arquitectura clásica.



Figura 3. Cementerio general de la ciudad de Mérida, Yucatán, incluida en el estudio.

### 5.3. Colecta de mosquitos

En las iglesias, los mosquitos adultos fueron capturados entre 08:00 - 13:00 hrs, con aspiradores de mochila (Prokopack Aspirator®, modelo 1419, Jonh W. Hock company), siguiendo la metodología descrita por García-Rejón et al (2008). El aspirado fue con especial atención en lugares oscuros y húmedos donde se refugian los mosquitos dentro de la iglesia y alrededor de ella. En el exterior se revisaron bodegas y los lugares sombreados del jardín.

En el cementerio, los mosquitos adultos fueron capturados con trampa centinelas (BG-Sentinel traps ®, Biogents Sentinel, Regensburg, Germany), las cuales, usan una mezcla de compuestos sintéticos (BG-Lure®, BioGents GmbH, Germany) derivados de olores del humano (amonio, ácido láctico, y ácido caproico) como atrayentes de mosquitos. Dentro del cementerio, y cerca de las tiendas de flores, fue seleccionado un transecto de 170 m, en el cual se instalaron 10 trampas; a una distancia de 17 m entre cada trampa (Figura 3). Las trampas fueron activadas entre 07:00 a 11:00 hrs. Simultáneamente con la colecta de adultos, se realizó la colecta de las etapas inmaduras, en las cuales, se registró el tipo de contenedor, la presencia y ausencia de agua. Todas las larvas y pupas de cada criadero fueron extraídas con pipetas de plástico y mallas de

tela (Malla de 100  $\mu\text{m}$ ) y colocadas en recipientes de plástico debidamente etiquetadas. La clasificación de los contenedores fue siguiendo la metodología descrita por García-Rejón y colaboradores (2011). En el cementerio, la colecta de inmaduros se realizó en un área de 100 m<sup>2</sup> alrededor del transecto de 170 m.



Figura 4. Trampa centinela (n = 10) usadas para la captura de mosquitos adultos en el cementerio.

Los mosquitos adultos colectados fueron depositados en recipientes de plástico, etiquetado con la fecha, tipo de cuarto o tipo de criadero, colonia y fueron transportados vivos al laboratorio de Arbovirología del Centro de Investigaciones Regionales Dr. Hideyo Noguchi de la Universidad Autónoma de Yucatán. La identificación morfológica de los mosquitos fue realizada bajo estereoscopio (Carl ZEISS MicroImaging®, Germany), usando claves morfológicas dicotómicas (Carpenter y LaCasse 1965, Darsie y Ward 2005). Posteriormente a la identificación taxonómica, las hembras de *Ae. aegypti* fueron guardados a -80 °C para realizar la identificación de arbovirus y la preferencia alimenticia.

#### 5.4. Determinación del ciclo gonotrófico

En días continuos se colectaron hembras de *Ae. aegypti* para estimar el periodo de tiempo entre dos comidas sucesivas de sangre. En las iglesias, se realizó la colecta durante 25 días consecutivos, tanto en época de lluvias (29 de septiembre a 23 octubre de 2015) como en secas (12 de abril a 6 de mayo de 2016). En el cementerio, la colecta fue de 19 días en lluvias (del 06 al 24 de septiembre de 2016) y secas (20 de abril al 08 de mayo de 2016).

Antes de determinar el ciclo gonotrófico, se identificó el estado trófico y paridad de las hembras de *Ae. aegypti*. La clasificación de la digestión de la sangre fue por observación directa del abdomen y fueron agrupadas como lo indica la Organización Mundial de la Salud (1975): sin alimentación sanguínea (I, el abdomen colapsado y los ovarios ocupan un tercio del abdomen); alimentación reciente (II, con sangre roja brillante y los ovarios ocupan dos o tres segmentos ventralmente y cuatro dorsalmente); medio grávidas ( III-IV, con sangre de color rojo oscuro y los ovarios ocupan de cuatro a cinco segmentos ventralmente y seis dorsalmente); sub grávidas (V, con sangre muy reducida y de color oscuro, los ovarios ocupan la mayor parte del abdomen); y grávidas (VI-VII, con huevos en el abdomen) (Figura 5) . Para identificar la paridad, se realizó la extracción de ovarios bajo estereoscopio de 10X, usando una gota de solución salina (NaCl al 0.9%) por cada ejemplar. Las hembras nulíparas son aquellas que nunca han puesto huevos y son identificadas por la presencia de traqueolas enrolladas en forma de nudos en los ovarios. Mientras que, las hembras paridas son aquellas que han puesto huevos en alguna ocasión y son identificadas porque sus traqueolas se observan como hilos sueltos o desenrolladas en los ovarios (Figura 6) (Detinova et al. 1962).

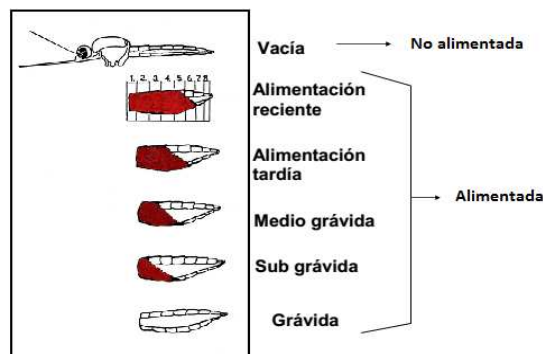


Figura 5. Estado de Sella o índice de digestión sanguínea (WHO 1975).

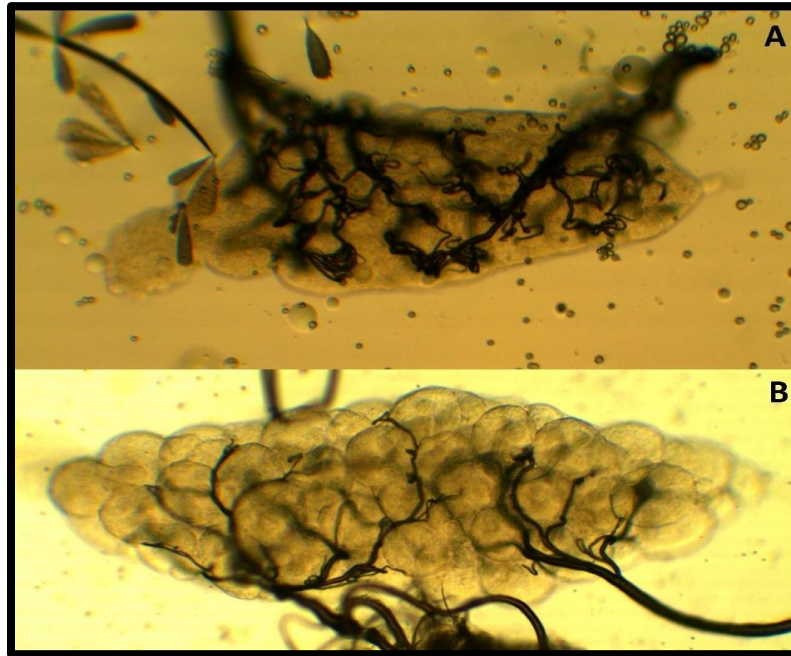


Figura 6. Ovarios de *Ae. aegypti*. A) Ovario de una hembra nulípara, las traqueolas enrolladas en nudos en los ovarios; B) Ovario de una hembra parida, las traqueolas se observan en forma de hilos sueltos o desenrolladas.

Suposiciones del método de Birley y Rajagopalan (1981) para estimar el ciclo gonotrófico: a) Se deben obtener series continuas de tiempo en muestreos diarios de una población estable con un mínimo de 19 días, donde las hembras nulíparas y paridas tengan la misma probabilidad de ser colectadas a partir de la población; b) El método de muestreo debe tener confiabilidad y precisión; c) El reclutamiento de las hembras nulíparas en la población es por natalidad e inmigración; d) Las hembras deben tomar una sola comida de sangre por ciclo gonotrófico; e) La duración del ciclo gonotrófico es independiente a la edad; f) La mortalidad, dispersión y emigración deben ser indistinguibles; y g) La supervivencia es independiente de la edad.

Para el análisis de datos, se crearon series de tiempo de 22 y 19 días en iglesias y cementerio, respectivamente. Cada serie de tiempo se construyó usando el número de hembras paridas como la variable dependiente y el número total de hembras como la variable independiente. Entonces, la duración del ciclo gonotrófico fue estimado con el análisis de correlación cruzada (Birley y Rajagopalan 1981) con la siguiente fórmula:

$$M_t = P_u T_{(t-u)}$$

Donde:

M: Es el número de paridas individuales capturadas en el día (t); P: es la sobrevivencia por ciclo gonotrófico;  $T_{(t-u)}$ : es el número total de hembras (núlparas y paridas) capturadas en el día (t-u); y u: es la duración del ciclo gonotrófico. Para predecir la duración del ciclo gonotrófico, el coeficiente de correlación (r) para el día 0 representa la correlación entre pares de datos de mosquitos P y  $T_t$  capturados en el mismo día. La r por día se obtuvo emparejando datos P diarios con los datos T correspondientes de un día antes. Del mismo modo, r para el día 1 se obtuvo emparejando datos de  $P_t$  diarios con los datos de  $T_t$  correspondientes 1 día antes. La r para el día 2 se calculó emparejando datos de  $P_t$  diarios con los datos de  $T_t$  correspondientes 2 días antes, y así sucesivamente. Se supuso que un coeficiente de correlación cruzada (r) significativo entre las series de tiempo expresa un tiempo de retraso ( $\log u$ ) equivalente a la duración del ciclo gonotrófico, con picos descendentes en estos intervalos. El coeficiente de correlación más alto (r) significativo (prueba t) obtenido después del día cero ( $u = 0$ ) determina el número de días por ciclo gonotrófico de las poblaciones de campo del vector. Se consideró significativos con  $P \leq 0.05$  cuando los valores eran más altos que  $\pm 1.96/\sqrt{n}$ .

Para evitar picos falsos en los coeficientes de correlación causados por factores no controlados como la inconsistencia en las colecciones cotidianas o colecciones dominadas por perturbaciones, los datos originales se transformaron (filtración) mediante una ecuación auto regresiva con un retraso de un día:

$Z_t = X_t - \beta(X_{t-1})$ , donde  $Z_t$  son los datos transformados (filtrados);  $X_t$ : es la serie de tiempo a ser filtrada (número de hembras paridas colectados en el día t);  $X_{t-1}$  es el total de hembras recolectadas antes del día t; y  $\beta$  es la estimación del parámetro auto regresiva (valor de la pendiente de la regresión lineal aplicada a los datos).

La tasa de supervivencia diaria (p) se calculó a partir de la proporción de paridad utilizando el método de Davidson (1954): con  $p = (PR)^{1/CG}$ , donde PR es la proporción de paridad y CG es la duración del ciclo gonotrófico. La proporción de paridad diaria se obtuvo dividiendo el número de hembras paridas por el número total de diseccionadas en el día. La media del índice de paridad total se obtuvo dividiendo el total de paridas por el total de hembras diseccionadas.

## 5.5. Oogenesis

Se colectaron pupas de *Ae. aegypti* en las iglesias. Estas fueron transportadas al insectario del laboratorio de Arbovirología y fueron depositadas en recipientes de plástico para esperar la emergencia de los adultos. Los machos y hembras se mantuvieron en jaulas de metal de 30 x 30 x 30 cm, y recubierto con tela mosquitera. Los adultos se alimentaron con agua de azúcar al 10 % *ad libitum*. Usualmente, el insectario está bajo condiciones controladas de 12:12 hrs (Luz: oscuridad) y humedad relativa de 70-80%. Para el estudio de la oogenesis fueron usadas hembras con cuatro días de edad y fue realizado como método alterno para comprobar la duración del ciclo gonotrófico de las hembras colectadas en campo. El desarrollo del ovario fue determinado en función de la aparición de los folículos ováricos (Estados de Christopher's) (Figura 7).

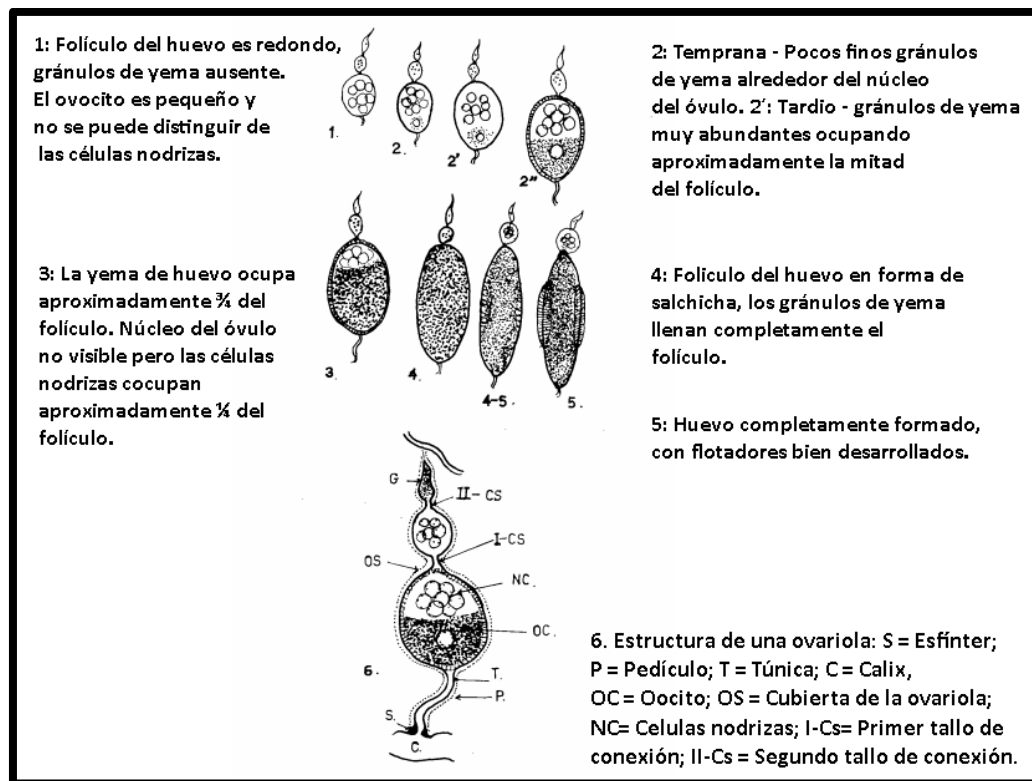


Figura 7. Análisis del desarrollo del ovario por medio de los estados de Christopher's (Who, 1975).

Al inicio del estudio, fueron extraídas los ovarios de diez hembras no alimentadas (sin restos de sangre) para determinar su estado de maduración ovárica. Al lote de las hembras restantes, fueron alimentadas con ratones durante 10 minutos (autorización de ética animal: CEI082015-CIR-UADY). Las hembras con el abdomen completamente llenas de sangre fueron seleccionadas y guardadas en jaulas. Durante el estudio, las hembras fueron alimentadas con agua de azúcar al 10 % *ad libitum*. A las 12 hrs después de la alimentación sanguínea de *Ae. aegypti* y continuando cada 6 hrs hasta la madurez de los huevos, se disecaron grupos de 10 mosquitos para determinar las etapas de Christopher's. Los oocitos se fotografiaron utilizando un microscopio de luz invertida (32 / 0.4X) acoplado a una cámara digital (ScopePhoto 3.1®).

### **5.6. Preferencias alimenticias de *Ae. aegypti* colectado en iglesias**

Para este objetivo, solamente se usaron hembras con alimentación reciente (estado de sella II). El abdomen de cada mosquito fue separado del resto del cuerpo y se colocaron individualmente en tubos eppendorf de 1,5 ml. El abdomen se homogenizó manualmente en 300 µl de suero fetal bovino al 2%. El ADN se preparó usando un kit de sangre y tejido DNeasy (Qiagen, Valencia, CA) siguiendo los protocolos del fabricante. Después de la centrifugación, el sobrenadante fue recuperado y fue almacenado a -80°C hasta el análisis.

Un fragmento del gen del citocromo b mitocondrial (228 pares de bases) fue amplificado mediante PCR utilizando cebadores específicos para humanos [5'TTCGGCGCATGAGCTGGAGTCC-3'(adelante) y 5'TATGCGGGGAAACGC CATATCG-3'(reverso) (Chang et al. 2008). Un volumen final de 25 µl para la reacción de PCR fue preparado, el cual, contenía 2,5 µl de ADN, 2.5 µl de buffer 5x, 2.0 µL de MgCl<sub>2</sub> (25 mM), 0.2 µL de dNTP's, 0.15 µL de Taq polimerasa y 1.0 µL de cebador a una concentración de 10 mM. Esta mezcla de reactivos fue sometida a ciclos térmicos dentro de un termociclador, que consistió en la incubación a 94 °C durante 2 minutos, 35 ciclos a 94 °C durante 30 segundos, 70 °C durante 30 segundos, y 72 °C durante 30 segundos; seguidos de un alargamiento final de 72 °C durante 10 minutos. Se incluyeron controles negativos (agua) y positivos (sangre humana) en cada PCR. Los productos amplificados de PCR (10 µl) fueron depositados en gel de agarosa al 2% (Promega

Corp., Madison, WI) teñidos con bromuro de etidio) y visualizados en un fotodocumentador (Doc™ XR+ Gel) (Chang et al. 2008).

Las muestras que no amplificaron con los cebadores específicos de humanos fueron analizadas con oligos del gen del citocromo b universales de mamíferos (772 pares de bases) y aves (508 pares de bases) (Chang et al. 2008). Los productos de PCR fueron purificados con un kit de recuperación de ADN Zymoclean Gel Cat (D4008) y secuenciados en el equipo DNA sequencer modelo 3500xL (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

Las secuencias fueron ingresadas y alineadas en el BLAST (por sus siglas en inglés: Basic Local Alignment Search Tool, disponible en <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) para encontrar regiones de similitud local entre secuencias de nucleótidos y poder identificar la sangre del huésped de quien se alimentó *Ae aegypti*.

### **5.7 Identificación de arbovirus en *Ae. aegypti***

Para la extracción del ARN viral de la familia *Flaviviridae*, las hembras de *Ae. aegypti* colectadas en cementerio e iglesias fueron organizados en pools ( $\leq 15$  mosquitos). Los pools fueron homogenizados mecánicamente con pistilos estériles y medio L-15 dentro de tubos Eppendorf. Los mosquitos fueron centrifugados a 3.000 rpm durante 7 min para separar el ADN y el resto del cuerpo de los mosquitos (patas, alas, etc). Para extraer el ARN viral, fue tomado una alícuota de 100  $\mu$ l con el material genético y agregado a las columnas RNeasy Kit (QIAGEN, Valencia, CA).

Para realizar la RT-PCR fueron usados los oligos cFD2 (5'GTGTCCCAG CCGGCGGTGTCATCAGC-3'), y FS778 (5' - AARGGHAGYMC DGCHATHT GGT - 3'), los cuales amplifican una región de 250 pares de bases del gen NS5 de los flavivirus (Scaramozzino et al. 2001). Para la identificación del VCHIK se usaron los oligos CHIK856 (5'- ACCATCGGTGTTCCATCTAAA6-3') y CHIK962c (5'- GCCTGGGCTGATCGTTATT-3'), los cuales, amplifican una región de 106 pares de bases del gen NS1 (Cigarroa-Toledo et al. 2016). La RT-PCR fue realizado en un volumen final de reacción de 25  $\mu$ l, el cual, contenía 2.5  $\mu$ l del RNA extraído, 2.0  $\mu$ L de MgCl<sub>2</sub> (25 mM), 2.5  $\mu$ L de buffer 5x, 0.2  $\mu$ L de dNTP's, 0.15  $\mu$ L de Taq polimerasa, 0.5  $\mu$ L del primer a la concentración de 10 mM. Las condiciones de amplificación

fueron las siguientes: una desnaturalización inicial de 95 °C durante 1 minuto, seguido de 35 ciclos de desnaturalización a 95 °C durante 1 minuto, hibridación a 75 °C durante 1.5 minutos y extensión a 72 °C durante 7 minutos. Los amplicones fueron visualizado en gel de agarosa al 2% con 0,5 µg / ml de bromuro de etidio a través de un fotodocumentador (Doc <sup>TM</sup> XR + Gel). Los productos de RT-PCR positivos a flavivirus fueron purificados con el kit de extracción Purelink Gel (Invitrogen®) y secuenciados en el equipo DNA sequencer modelo 3500xL (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

### 5.8. Cultivo celular

Los sobrenadantes de los pools positivos fueron filtrados a través de una malla de 0.45 µm (miliporo) para eliminar las partículas grandes, incluidas las bacterias. El producto filtrado fue inoculado en monocapas subconfluentes de células C6/36 (*Aedes albopictus*) dentro de matraces de 25 cm<sup>2</sup>. Las células se incubaron durante 7 días a 28 °C. Se realizó un segundo y tercer pasajes ciego en células C6/36 y células Vero (a partir de riñón de mono verde africano), respectivamente. Las células Vero se incubaron entre 3 y 7 días a 37 °C con 5% de CO<sub>2</sub>. Las células se rasparon de los matraces después de cada paso y se centrifugaron a 10,000 rpm durante 10 min a 4°C. El sobrenadante fue colectado y almacenado a -80°C. Los sedimentos celulares se re suspendieron en Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) y se extrajo el ARN total siguiendo las instrucciones del fabricante (Cigarroa-Toledo et al. 2016).

### 5.9. Análisis de datos

Los estados inmaduros de *Ae. aegypti* fueron evaluados con los siguientes indicadores entomológicos:

$$\text{Índice de recipientes positivos (IRP)} = \frac{\text{Recipientes positivos con larvas}}{\text{Recipientes con agua explorado}} \times 100$$

$$\text{Índice de recipiente positiva a Pupas (IPP)} = \frac{\text{Recipientes positivas a pupas}}{\text{Recipientes positivos a larvas}} \times 100$$

Cada índice fue comparado con criterios operativos entomológicos de la Secretaria de Salud de México, donde ≤ 1% es óptimo, 1-2% es bueno, 2-5% es señal de alarma, y ≥ 5% es señal de emergencia (SSM 2017).

Los datos fueron sometidos a la prueba de normalidad (Kolmogorov-Smirnov) y homogeneidad de varianza (Levene). Cuando fue necesario, los datos fueron transformados para que éstos tuvieran distribución normal. La abundancia de los estados inmaduros de *Ae. aegypti* entre temporadas fueron transformados ( $\text{Log}_{10}$ ) y analizados con la prueba *t* para muestras independientes. La abundancia de las hembras de *Ae. aegypti* entre temporadas fue analizado con la prueba de U de Mann–Whitney. Los análisis estadísticos fueron realizados con el paquete estadístico IBM SPSS versión 22 para Windows (IBM Corporation, Armonk, NY), los resultados se consideraron significativos cuando *P* bilateral  $\leq 0.05$ .

La tasa mínima de infección fue calculada como: (número de pools positivos/total de hembras de *Ae. aegypti* analizados) x 1000.

#### **5.10. Análisis filogenético molecular basado en el gen NS5**

Las secuencias fueron alineadas manualmente y editadas con Bioedit v.7.0.9 (Hall 2011) y Mega v.7 (Kumar et al. 2016). Posteriormente, fueron comparadas con secuencias disponibles en el GeneBank (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Las secuencias también fueron traducidas a aminoácidos con el programa bioinformático ExPASy (<http://web.expasy.org/translate/>). El software DnaSP v.5.10 (Librado y Rozas 2009) fue utilizado para identificar las variantes genéticas entre serotipos del dengue y Zika. El software Mega v.7 (Kumar et al. 2016) fue empleado para medir la distancia genética entre variantes genéticas con 10,000 permutaciones al azar mediante el método de Kimura 2-parámetro (K2P).

El mejor modelo de sustitución se obtuvo utilizando el software jModelTest (Posada 2008). La Inferencia Bayesiana fue analizado con el software MrBayes v.3.2 (Ronquist et al. 2012). Cuatro cadenas de Markov Chain Monte Carlo fueron ejecutadas durante 10,000,000 generaciones (se tomaron muestras cada 1000 generaciones) para permitir un tiempo adecuado para la convergencia (= 0,004866). El primer 25% de los árboles muestreados se consideraron como entrenamiento. El árbol filogenético fue visualizado con el software FigTree v.1.4.

## 6. RESULTADOS

### 6.1 Abundancia de la etapa inmadura de *Ae. aegypti* y otros mosquitos en iglesias

Durante todo el periodo de estudio, fueron registrados 2,918 recipientes. De estos, el 27.55% (804/2,918) tenían agua al momento de la revisión y el 8.08% (65/804) tenían larvas y pupas. La abundancia absoluta de los estados inmaduros fue 10,997, lo cual, incluyó a cinco especies (Tabla 2). La especie más abundante fue *Ae. aegypti* (n = 6,051), seguido por *Culex quinquefasciatus* Say (n = 3,018), *Culex nigripalpus* Theobald (n = 1,894), *Culex thriambus* Dyar (n = 26) y *Culex interrogator* Dyar y Knab (n = 8). Cuando se comparó el promedio de los estados inmaduros de *Ae. aegypti* (datos transformados a  $\text{Log}_{10}$ ) por temporadas, no se observó diferencia estadística significativa entre ellos ( $t = 0.872$ ,  $df = 63$ ,  $P = 0.386$ ). Sin embargo, el número de larvas y pupas fue cinco veces mayor en lluvias comparado con la temporada de secas. En ambas temporadas, las cubetas, contenedores grandes (capacidad de almacenamiento  $\geq 5\text{L}$ ) y los recipientes desechables fueron más productivos para *Ae. aegypti*.

En la temporada de lluvias fueron registrados 1,758 recipientes; de los cuales, el 37.77% (664/1,758) tenían agua al momento de la revisión y el 8.28% (55/664) tenían larvas y pupas (Tabla 3). La abundancia absoluta de los estados inmaduros fue 9,234, lo cual, representó a cuatro especies. La especie más abundante fue *Ae. aegypti* (n = 5,010), seguido por *Cx. quinquefasciatus* (n = 2,716), *Cx. nigripalpus* (n = 1,894) y *Cx. interrogator* (n = 8). Las cubetas (n = 25), contenedores grandes (n = 13) y los recipientes desechables (n = 13) fueron más productivos para *Ae. aegypti*. Los tres criaderos produjeron el 93.13% (4,666/5,010) de las larvas y pupas de *Ae. aegypti*.

Tabla 2. Composición de especies de mosquitos y abundancia de sus estados inmaduros en iglesias de la ciudad de Mérida, Yucatán, México.

Temporada / Especies de mosquitos	Total de inmaduros colectados	
	Larvas	Pupas
Lluvias		
<i>Aedes aegypti</i>	4,731	279
<i>Culex quinquefasciatus</i>	2,648	68
<i>Culex nigripalpus</i>	1,847	47
<i>Culex interrogator</i>	8	0
Total	9,234	394
Secas		
<i>Aedes aegypti</i>	1,005	36
<i>Culex quinquefasciatus</i>	291	11
<i>Culex thriambus</i>	26	0
Total	1,322	47
Total general	10,556	441

Durante la temporada de secas, fueron registrados 1,166 recipientes; de los cuales, el 12% (140/1,166) tenían agua al momento de la revisión y el 7.14% (10/140) tenían larvas y pupas (Tabla 3). La abundancia absoluta de los estados inmaduros fue 1,322, lo cual, representó a tres especies. La especie más abundante fue *Ae. aegypti* (n = 1,041), seguido por *Cx. quinquefasciatus* (n = 302) y *Cx. thriambus* (n = 26). Las cubetas (n = 6) y los contenedores grandes (n = 4) fueron los únicos criaderos registrados en esta temporada, lo cual, produjo el 100% de las larvas y pupas de *Ae. aegypti*.

Tabla 3. Abundancia de los estados inmaduros de *Ae. aegypti* colectados en iglesias de la ciudad de Mérida, Yucatán, México.

Temporada / Recipientes	Total de recipientes examinados/ con agua	Recipientes con:		Total de:	
		Larvas	Pupas	Larvas	Pupas
Lluvias					
Cubetas	242/129	25	14	2,898	211
**Rec. desechables	1,099/379	13	7	580	30
*Rec. grandes	97/35	13	4	922	25
Floreros	57/34	1	1	40	8
Macetas	172/38	1	1	115	5
Llantas	11/2	1	0	88	0
Inodoros sin uso	6/2	0	0		
Alcantarillas	68/45	1	0	88	0
Total	1,752/664	55	27	4,731	279
Secas					
Cubetas	205/72	6	2	785	33
**Rec. desechables	692/31	0	0		
* Rec. grandes	52/8	4	1	220	3
Floreros	3/3	0	0	0	0
Macetas	157/15	0	0	0	0
Llantas	2/0	0	0	0	0
Alcantarillas	55/11	0	0	0	0
Total	1,166/140	10	3	1,005	36
Total general	2,918/804	65	30	5,736	315

\*\*Rec desechables: recipientes desechables. \*Rec. grandes: Recipientes grandes con capacidad mayor de 5 lt.

## 6.2 Abundancia de la población adulta de *Ae. aegypti* y otros mosquitos en iglesias

En todo el estudio fueron colectados 21,226 mosquitos, lo cual, representó a nueve especies (Tabla 4). El 36.31% (7,708/21,226) de los mosquitos colectados fueron hembras. Las hembras de *Cx. quinquefasciatus* (n = 4,686) fueron las más abundantes en la colección, seguido por *Ae. aegypti* (n = 1,380), *Aedes taeniorhynchus* (Wiedemann) (n = 1,172) y *Cx. nigripalpus* (363). Estas cuatro especies, representaron el 98.61% (7,601/7,708) de las hembras colectadas y fueron comunes en ambas temporadas. Las otras especies de la colección son *Cx. interrogator* (n = 67), *Aedes trivittatus* (Coquillett) (n = 35), *Psorophora ferox* (von Humboldt) (n = 3), *Culex coronator* Dyar and Knab (n = 1), and *Culex stigmatosoma* Dyar (n = 1).

Cuando se comparó la abundancia de las hembras de *Ae. aegypti* por temporadas, se observó diferencia estadística significativa ( $Z = -4.579$ ,  $P \leq 0.05$ ). En temporada de lluvia, se colectó más de cinco veces el número de hembras de *Ae. aegypti* (n = 1,178) comparado con temporada de secas (n = 202). En general, el 44.57% (615/1,380) de las hembras fueron registradas como alimentadas, el 38.12% (526/1,380) como no alimentadas y el 17.32% (239/1,380) como grávidas.

En la temporada de lluvias, fueron colectados 12,460 mosquitos, lo cual, representó a nueve especies. El 37.97% (4,731/12,460) de los mosquitos colectados fueron hembras. Las hembras de *Cx. quinquefasciatus* (n = 1,965) fueron las más abundantes en la colección, seguido por *Ae. aegypti* (n = 1,178) y *Ae. taeniorhynchus* (n = 1,160). Estas tres especies, representaron el 90.95% (4,303/4731) de las hembras colectadas. Hubo diferencia estadística significativa entre el estado trófico de *Ae. aegypti* ( $X^2 = 13.486$ ,  $g.l. = 2$ ,  $P = 0.001$ ). El 45.50% (536/1,178) de las hembras fueron registradas como alimentadas, el 37.10% (437/1,178) sin alimentar y el 17.40% (205/1,178) como grávidas.

Durante la temporada de secas, fueron colectados 8,766 mosquitos, lo cual, representó a cuatro especies. El 33.96% (2,977/8,766) de los mosquitos colectados fueron hembras. Las hembras de *Cx. quinquefasciatus* (n = 2,721) y *Ae. aegypti* (n = 202) fueron los más abundantes en la colección. Estas dos especies, representaron el 98.19% (2,923/2,977) de las hembras colectadas. No se observó diferencia estadística significativa por estado trófico de *Ae. aegypti* ( $X^2 = 0.590$ ,  $g.l. = 2$ ,  $P = 0.744$ ). Fue

similar el número de hembras no alimentadas (n = 89) y alimentadas (n = 79). Mientras que, el número de hembras grávidas fue menor (n = 34).

Tabla 4. Composición y abundancia de mosquitos adultos capturadas en las iglesias de la ciudad de Mérida, Yucatán, México.

Temporada / mosquitos	Total de adultos colectados		Estado trófico		
	Machos	Hembras	Sin alimentar	Alimentadas	Grávidas
Lluvias					
<i>Ae. aegypti</i>	2,236	1,178	437	536	205
<i>Ae. taeniorhynchus</i>	306	1,160	483	320	357
<i>Ae. trivittatus</i>	0	35	11	5	19
<i>Cx. coronator</i>	0	1	1	0	0
<i>Cx. interrogator</i>	21	67	53	5	9
<i>Cx. nigripalpus</i>	129	321	185	12	124
<i>Cx. quinquefasciatus</i>	5,037	1,965	1,043	559	363
<i>Cx. stigmatosoma</i>	0	1	0	1	0
<i>Ps. ferox</i>	0	3	1	1	1
Total	7,729	4,731	2,214	1,439	1,078
Secas					
<i>Ae. aegypti</i>	286	202	89	79	34
<i>Ae. taeniorhynchus</i>	9	12	6	2	4
<i>Cx. nigripalpus</i>	2	42	35	2	5
<i>Cx. quinquefasciatus</i>	5,492	2,721	1,945	619	157
Total	5,789	2,977	2,075	702	200
Total general	13,518	7,708	4,289	2,141	1,278

### 6.3 Abundancia de la etapa inmadura de *Ae. aegypti* y otros mosquitos en cementerio

En todo el estudio fueron registrados 4,867 floreros. De estos, el 16.29% (793/4,867) tenían agua al momento de la revisión y el 22.95% (182/793) tenían larvas y pupas (Tabla 5). La abundancia absoluta de los estados inmaduros fue 10,411, lo cual, representó a cuatro especies (Tabla 6). La especie más abundante fue *Ae. aegypti* (n = 8,627), seguido por *Cx. quinquefasciatus* Say (n = 1,663), *Cx. nigripalpus* (n = 69) y *Culex coronator* (n = 52). Cuando se comparó la abundancia de los estados inmaduros de *Ae. aegypti* entre temporadas, no se observó diferencia estadística significativa ( $Z = -0.142$ ,  $P = 0.887$ ). El índice de pupa general fue 41.72.

Tabla 5. Datos sobre recipientes examinados y la abundancia de los estados inmaduros de *Ae. aegypti* colectados en el cementerio de la ciudad de Mérida, Yucatán, México.

Temporada	Total de recipientes examinados/ con agua	Total de:		Porcentaje de recipientes con larvas y pupas	Índice de pupas (%)
		Larvas	Pupas		
Secas	1,853 / 354	3,084	193	19.77	32.85
Lluvia	3,014 / 439	4,968	382	25.51	47.32
Total	4867 / 793	8,052	575	22.95	41.72

En la temporada de lluvias, fueron registrados 3,014 floreros; de los cuales, el 14.56% (439/3,014) tenían agua al momento de la revisión y el 25.51% (112/439) tenían larvas y pupas. La abundancia absoluta de los estados inmaduros fue 6,543, lo cual, representó a tres especies. La especie más abundante fue *Ae. aegypti* (n = 5,756), seguido por *Cx. quinquefasciatus* (n = 735) y *Cx. coronator* (n = 52). El índice de pupas fue 47.32.

En la temporada de secas, fueron registrados 1,853 floreros; de los cuales, el 19.10% (354/1,853) contenían agua al momento de la revisión y el 19.77% (70/354) tenían larvas y pupas. La abundancia absoluta de los estados inmaduros fue 3,868, lo cual, representó a tres especies. La especie más abundante fue *Ae. aegypti* (n = 2,871), seguido por *Cx. quinquefasciatus* (n = 928) y *Cx. nigripalpus* (n = 69). El índice de pupas fue 32.85.

Tabla 6. Composición de especies de mosquitos y abundancia de sus estados inmaduros en el cementerio de la ciudad de Mérida, Yucatán, México.

Temporada / Mosquitos	Total de inmaduros colectados	
	Larvas	Pupas
Lluvias		
<i>Ae. aegypti</i>	5,388	368
<i>Cx. quinquefasciatus</i>	728	7
<i>Cx. coronator</i>	52	0
total	6,168	375
Secas		
<i>Ae. aegypti</i>	2,664	207
<i>Cx. quinquefasciatus</i>	769	159
<i>Cx. nigripalpus</i>	69	0
Total	3,502	366
Total general	9,670	741

#### **6.4 Abundancia de la población adulta de *Ae. aegypti* y otros mosquitos en cementerio**

En todo el estudio fueron colectados 3,957 mosquitos, lo cual, representó a cuatro especies (Tabla 7). El 44.45% (1,759/3,957) de los mosquitos colectados fueron hembras. Las hembras de *Ae. aegypti* (n = 1,648) fueron las más abundantes en la colección, seguido por *Ae. taeniorhynchus* (n = 77), *Ae. trivittatus* (n = 17) y *Cx. quinquefasciatus* (n = 17). *Ae. aegypti* representó el 93.68% (1,648/1,759) de las hembras en la colección.

En la temporada de lluvias, fueron colectados 3,539 mosquitos, lo cual, representó a cuatro especies. El 44.30 % (1,568/3,539) de los mosquitos colectados fueron hembras. Las hembras de *Ae. aegypti* (n = 1,471) fueron las más abundantes en la colección, lo cual, representó el 93.81% (1,471/1,568) de las hembras colectadas. Hubo diferencia estadística significativa por estado trófico de *Ae. aegypti* ( $X^2 = 135.49$ , *g.l.* = 2,  $P = 0.000$ ). El 82.27% (1,210/1,471) de las hembras fueron registradas como no alimentadas, el 9.51% (140/1,471) como grávidas y el 8.22 % (121/1,471) como alimentadas.

En la temporada de secas, fueron colectados 418 mosquitos, lo cual, representó a dos especies. El 45.69 % (191/418) de los mosquitos colectados son hembras. Las hembras de *Ae. aegypti* (n = 177) fueron las más abundantes en la colección, lo cual, representó el 92.67% (177/191) de las hembras colectadas. Hubo diferencia estadística significativa por estado trófico de *Ae. aegypti* ( $X^2 = 12.79$ , *g.l.* = 2,  $P = 0.002$ ). El 66.10% (117/177) de las hembras fueron registradas como no alimentadas, el 26% (46/177) como grávidas y el 7.90 % (14/177) como alimentadas.

Tabla 7. Composición y abundancia de mosquitos adultos capturadas en el cementerio de la ciudad de Mérida, Yucatán, México.

Temporada / Mosquitos	Total de adultos colectados		Estado trófico		
	Machos	Hembras	Sin alimentar	Alimentadas	Grávidas
Lluvias					
<i>Ae. aegypti</i>	1,969	1,471	1,210	121	140
<i>Ae. taeniorhynchus</i>		77	57	4	16
<i>Ae. trivittatus</i>	1	17	10	4	3
<i>Cx. quinquefasciatus</i>	1	3	1	1	1
Total	1,971	1,568	1278	130	160
Secas					
<i>Ae. aegypti</i>	220	177	117	14	46
<i>Cx. quinquefasciatus</i>	7	14	3	5	6
Total	227	191	120	19	52
Total general	2,198	1,759	1,398	149	212

### **6.5 Ciclo gonotrófico de *Ae. aegypti* y sobrevivencia diaria en iglesias**

En iglesias, la duración del ciclo gonotrófico fue cuatro días durante la temporada de lluvias con temperatura promedio de  $26.7 \pm 1.22^{\circ}\text{C}$  y  $79.44 \pm 5.64\%$  de humedad relativa. El índice de sobrevivencia diaria fue 0.94 y el índice de paridad fue 0.74 (Tabla 8). En esta temporada fueron colectados 329 hembras de *Ae. aegypti*. Entre estas, el 45% (148/329) de las hembras fueron registradas como alimentadas, el 36.46% (120/329) como no alimentadas y 18.54% (61/329) como grávidas. En temporada de secas, la duración del ciclo gonotrófico fue de tres días con temperatura promedio de  $29.8 \pm 1.47^{\circ}\text{C}$  y  $57.05 \pm 4.74\%$  de humedad relativa. El índice de sobrevivencia diaria fue 0.93 y el índice de paridad fue 0.81. En esta temporada fueron colectados 79 hembras de *Ae. aegypti*. Entre estas, el 55.7% (44/79) de las hembras fueron registradas como alimentadas, el 24.05% (19/79) como no estaban alimentadas y 20.25% (16/79) como grávidas.

Los coeficientes de correlación de los índices de paridad no fueron significativos ( $P \geq 0.05$ ) tanto con datos crudos como filtrados. Siguiendo el criterio de Bockarie y colaboradores (1995), el intervalo entre los valores altos de  $r$  fue considerado la duración del ciclo gonotrófico. En la temporada de lluvia, las correlaciones altas se observaron en el día tres, siete y once, lo cual, sugirió un ciclo gonotrófico de cuatro días (Tabla 8). En la temporada de secas, las correlaciones altas se observaron en el día dos, cinco y ocho, lo cual, sugirió un ciclo gonotrófico de tres días (Tabla 9).

### **6.6 Ciclo gonotrófico de *Ae. aegypti* y sobrevivencia diaria en cementerio**

La duración del ciclo gonotrófico fue cuatro días durante la temporada de lluvias con temperatura promedio de  $26.7 \pm 1.22^{\circ}\text{C}$  y  $79.44 \pm 5.64\%$  de humedad relativa. El índice de sobrevivencia diaria fue 0.89 y el índice de paridad fue 0.61. En esta temporada fueron colectados 541 hembras de *Ae. aegypti*. Entre estas, el 83% (448/541) de las hembras fueron registradas como no alimentadas, el 11% (60/541) como grávidas y el 6% (33/541) como alimentadas.

En temporada de secas, la duración del ciclo gonotrófico fue tres días a temperatura promedio de  $29.43 \pm 2.41^{\circ}\text{C}$  y  $57.16 \pm 5.56\%$  de humedad relativa. El índice de sobrevivencia diaria fue 0.83 y el índice de paridad fue 0.58 (Tabla 10). En esta temporada fueron colectados 86 hembras de *Ae. aegypti*. Entre estas, el 65% (56/86) de las hembras fueron registradas como no alimentadas, el 30% (26/86) como grávidas y el 5% (4/86) como alimentadas. En la temporada de lluvia, las correlaciones altas se observaron en el día cinco, nueve y trece, lo cual, sugirió un ciclo gonotrófico de cuatro días (Tabla 9). En la temporada de secas, las correlaciones altas se observaron en el día dos, cinco y ocho, lo cual, sugirió un ciclo gonotrófico de tres días (Tabla 9).

### **6.7 Vitellogenesis de *Ae. aegypti***

Al inicio del estudio, los ovarios de las hembras no alimentadas se registraron en el estado de Christopher's II (Figura 8). Después de tomar la alimentación sanguínea, los ovarios de las hembras completaron el desarrollo (estado de Christopher's V) en un tiempo mínimo de 60 hrs en temporada de lluvia y 54 hrs en temporada de secas. La duración del ciclo gonotrófico fue estimado indirectamente adicionando 24 hrs al tiempo mínimo requerido para desarrollar los huevos. De acuerdo al criterio de Mekuria y colaboradores (1991), las 24 hrs es el tiempo necesario para que una hembra grávida localice un criadero, deposite los huevos y encuentre un nuevo huésped para alimentarse. Por lo tanto, en temporada de lluvia fue estimado un ciclo gonotrófico de 3.5 días con una temperatura media de  $27.16 \pm 0.55^{\circ}\text{C}$  y 79.9% de humedad relativa. Mientras que, en temporada de secas fue estimado un ciclo gonotrófico de 3.25 días con una temperatura media de  $30.67 \pm 4.5^{\circ}\text{C}$  y 55.9% de humedad relativa (Tabla 11).

Tabla 8. Índice de paridad de *Ae. aegypti* colectado en las iglesias de la ciudad de Mérida, Yucatán, México.

Día	Temporada de lluvias			Temporada de secas		
	Nuliparas	Paridas	Índice de paridad	Nuliparas	Paridas	Índice de paridad
1	0	15	1,00	0	3	1,00
2	2	9	0,82	0	2	1,00
3	1	13	0,93	0	2	1,00
4	2	19	0,90	0	4	1,00
5	3	16	0,84	1	4	0,80
6	6	13	0,68	1	3	0,75
7	9	22	0,71	3	3	0,50
8	7	8	0,53	1	2	0,67
9	2	3	0,60	0	5	1,00
10	0	8	1,00	1	3	0,75
11	10	21	0,68	0	4	1,00
12	0	10	1,00	0	3	1,00
13	0	5	1,00	2	1	0,33
14	2	11	0,85	0	3	1,00
15	1	7	0,88	1	1	0,50
16	4	8	0,67	0	2	1,00
17	5	3	0,38	0	2	1,00
18	5	3	0,38	1	3	0,75
19	1	5	0,83	0	2	1,00
20	4	10	0,71	1	1	0,50
21	5	14	0,74	0	3	1,00
22	1	6	0,86	0	2	1,00
23	2	15	0,88	1	2	0,67
24	0	5	1,00	1	2	0,67
25	1	7	0,88	1	2	0,67
Total	73	256	0,78	15	64	0,81

Tabla 9. Duración del ciclo gonotrófico de *Aedes aegypti* capturados en iglesias y cementerio de la ciudad de Mérida, Yucatán, México.

Día	Iglesias. Coeficientes de correlación		Cementerio. Coeficientes de correlación	
	Datos filtrados en la temporada de lluvia	Datos filtrados en la temporada de secas	Datos crudos en la temporada de lluvia	Datos crudos en la temporada de secas
0	0.94	0.73	0,02	0.69
1	0.09	0.02	0,60	0.03
2	0.19	<b>**0.20</b>	0,56	<b>**0.02</b>
3	<b>*0.17</b>	0.09	0,01	0.00
4	0.16	0.18	0,00	0.02
5	0.01	<b>**0.44</b>	<b>*0,73</b>	<b>**0.38</b>
6	0.11	0.31	0,11	0.31
7	<b>*0.21</b>	0.17	0,43	0.14
8	0.17	<b>**0.37</b>	0,22	<b>**0.54</b>
9	0.10	0.14	<b>*0,73</b>	0.20
10	0.02	0.12	0,55	0.21
11	<b>*0.46</b>	0.01	0,29	-
12	0.11	0.27	0,14	-
13	-	-	<b>*0,64</b>	-
Temperatura	26.7 °C y 79.44% HR	29.8 °C y 57.05% HR	27.7°C y 80.44% HR	29.43°C y 57.16% HR
ISD:	0.94	0.93	0.89	0.83
	n = 329	n = 79	n = 541	n = 86

\*En la temporada de lluvia, los coeficientes de correlaciones altas aparecieron cada cuatro días. \*\* En la temporada de secas, los coeficientes de correlaciones altas aparecieron cada tres días. ISD: Índice de Supervivencia Diaria.

Tabla 10. Índice de paridad de *Ae. aegypti* colectado en el cementerio de la ciudad de Mérida, Yucatán, México.

Día	Temporada de secas			Temporada de lluvias		
	Nulíparas	Paridas	Índice de paridad	Nulíparas	Paridas	Índice de paridad
1	3	6	0,67	1	7	0,88
2	2	1	0,33	6	7	0,54
3	1	7	0,88	2	5	0,71
4	1	3	0,75	5	11	0,69
5	3	1	0,25	4	23	0,85
6	3	3	0,50	2	6	0,75
7	0	2	1,00	2	16	0,89
8	0	6	1,00	0	6	1,00
9	2	2	0,50	3	9	0,75
10	3	4	0,57	2	25	0,93
11	3	0	0,00	7	20	0,74
12	3	1	0,25	10	14	0,58
13	1	4	0,80	38	17	0,31
14	2	1	0,33	32	4	0,11
15	3	1	0,25	13	19	0,59
16	2	2	0,50	23	28	0,55
17	2	2	0,50	18	48	0,73
18	1	2	0,67	25	43	0,63
19	1	2	0,67	16	24	0,60
Total	36	50	0,58	209	332	0,61

Tabla 11. Vitellogenesis de *Ae. aegypti* en temporada de lluvias y secas, después de una alimentación sanguínea en laboratorio.

Horas post alimentación	No. de hembras observadas	% de hembras <sup>b</sup> / Lluvias (Estados de Christopher's)					% de hembras <sup>c</sup> / Secas (Estados de Christopher's)				
		I	II	III	IV	V	I	II	III	IV	V
		0	10	100					100		
12	10		100					100			
18	10		90	10				90	10		
24	10		<sup>a</sup> 80	20				<sup>a</sup> 40	60		
30	10		<sup>a</sup> 30	70				<sup>a</sup> 10	90		
36	10			10	90				60	40	
42	10				100					70	30
48	10				80	20				20	80
54	10				50	50					100
60	10					100		-	-	-	-

<sup>a</sup>estado de pre-gravidez

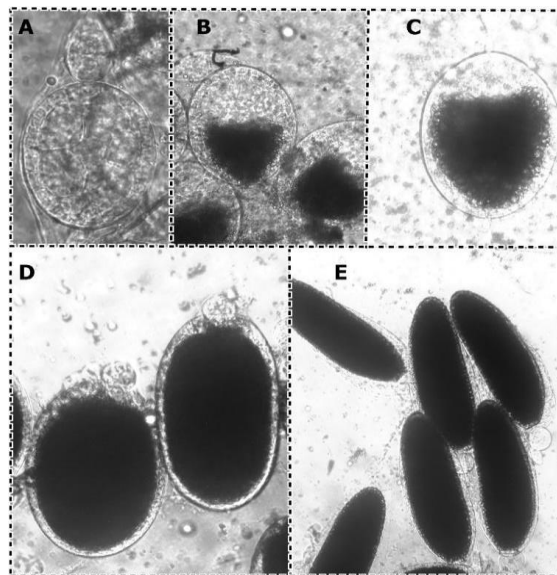


Figura 8. Desarrollo del huevo observado bajo microscopio de luz invertida (32/0.4X). Estado 1: no fue observado; (A) Etapa 2 temprana, inicio del estudio, hembras sin alimentar; (B) Etapa 2 tardío, 12 a 24 horas; (C) Etapa 3, 30 a 36 horas; (D) Etapa 4, 42 -48 horas; y (E) Etapa 5, 54 horas.

## 6.8 Preferencia alimenticia de *Ae. aegypti* en iglesias

El 21.15% (292/1,380) de las hembras fueron registradas con alimentación reciente y fueron usadas para la preferencia alimenticia de *Ae. aegypti*. Las hembras fueron agrupadas de acuerdo al nivel de la digestión de la sangre (estados de Sella) y por tipo de cuarto donde fueron colectados (Table 12). De estas, el 76.36% (223/292) fueron analizadas y todas las hembras de *Ae. aegypti* se alimentaron del humano (Figura 9). En el primer análisis, cinco muestras no amplificaron para el gen de cyt b específico de humano, por lo que fueron analizadas con oligos universales de mamífero. Los productos fueron secuenciados y alineados en el BLAST. En cuatro muestras secuenciadas no se pudo determinar el huésped del cual se alimentó *Ae. aegypti*, probablemente por degradación del ADN. Una muestra tuvo una identidad de nucleótidos del 93% similar con el humano (*Homo sapiens*), por lo cual, se concluyó que se alimentó de este huésped. Algo para destacar fue que el 71.62% (159/222) de los mosquitos alimentados fueron colectados del interior de la iglesia (Tabla 12).

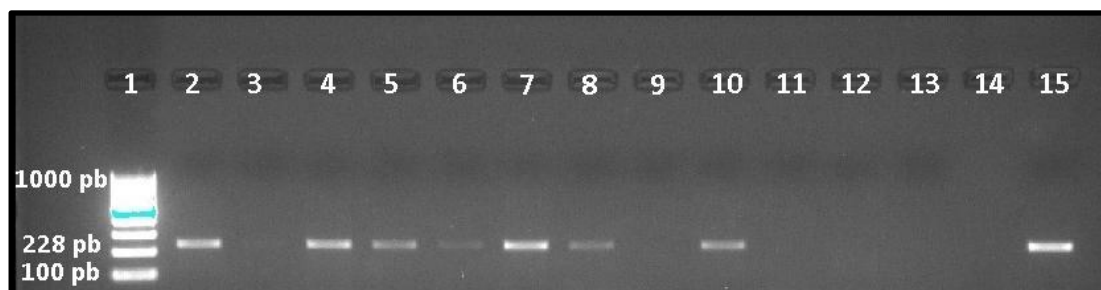


Figura 9. Análisis de la fuente sanguínea en *Ae. aegypti* con oligos específicos para humano (gen del Cyt b). Línea 1, marcador de peso molecular. Línea 2, 4-8, y 10 señalan que *Ae. aegypti* se alimentó de sangre de humano (producto de 228 pb). Línea 14, control negativo. Línea 15, control positivo (sangre de humano).

Tabla 12. Preferencia alimenticia de *Ae. aegypti* mediante gen del Cyt b.

Temporada / Cuarto	Digestión de la sangre (estado de Sella's)					Sangre de humano identificado
	I	II	III	IV	V	
Lluvias						
Interior	304	178	122	94	138	144
Bodega	36	13	6	3	16	8
Oficinas	17	31	14	13	12	17
Dormitorio	15	9	3	6	3	8
Baño	1	8	1	0	1	3
Salón clases	22	11	7	2	15	10
Exterior	42	8	4	3	20	5
Cocina	0	0	0	0	0	0
Secas						
Interior	39	15	18	4	18	15
Bodega	7	2	1	1	1	2
Oficina	21	16	10	8	12	10
Dormitorio	0	0	0	0	0	0
Baño	2	0	0	0	0	0
Salón clases	4	1	1	0	1	1
Exterior	4	0	0	1	2	0
Cocina	12	0	1	0	0	0
Grand total	526	292	188	135	239	223

I: Sin alimentar; II: Alimentación reciente; III: Medio grávida; IV: Sub grávida; y V: Grávida.

## 6.9 Identificación del virus dengue en iglesias y análisis filogenético

Fueron organizados 1,380 hembras de *Ae. aegypti* en 166 grupos (pools). Ningún pool fue positivo al VCHIK. Por RT-PCR y secuenciación Sanguer fueron confirmados dos pools positivos con el virus dengue. Un pool fue identificado como VDEN-1 y otro como VDEN-2. La tasa mínima de infección fue 1.5. Ambos pools positivos fueron identificados en la iglesia de Vergel III (oriente de Mérida) durante la temporada de lluvia (octubre de 2016) (Tabla 13). Las hembras de *Ae. aegypti* con ARN del VDEN fueron colectados dentro de la iglesia (VDEN-2) y otra en una bodega (VDEN-1).

Tabla 13. Identificación del virus dengue en hembras del mosquito *Ae. aegypti* colectadas en las iglesias de Mérida, Yucatán.

Zone	Colonia	Total de hembras analizadas	Pools analizados	Pools (+) de VDEN
Lluvias				
Oriente	Vergel-III	1,029	125	2
Sur	San Jose Tecoh	26	3	0
Centro	Bojorquez	123	14	0
Secas				
Oriente	Vergel-III	187	22	0
Sur	San Jose Tecoh	7	1	0
Centro	Bojorquez	8	1	0
Total		1,380	166	2

Por medio del BLAST, se realizó la comparación de las secuencias del presente estudio (DENV-1 y DENV-2) con otras secuencias de DENV depositadas en la base de datos del Genbank (Tabla suplementaria 1). La secuencia del VDEN-1 fue relacionado con el VDEN-1 aislado de un humano de Brasil en el 2015, con 98.5% de identidad de los nucleótidos (número de acceso en el genbank KU232287 y KU232286). La alineación de las secuencias de aminoácidos reveló que tienen un 95,6% de identidad y similitud. La secuencia del VDEN-2 fue relacionado con el VDEN-2 aislado de un humano de México en el 2011 (número de acceso en el genbank KJ189370), con 98% de

identidad de los nucleótidos y con 97.1% de identidad y similitud de las secuencias de aminoácidos.

El análisis filogenético fue realizado con 94 secuencias de DENV-1 y 101 secuencias de DENV-2. Las secuencias corresponden a 204 pares de bases de la región del gen NS5. Muchas secuencias fueron idénticas a otras y, por lo tanto, se consideraron como "variantes genéticas". Fue identificado diez variantes del VDENV-1, designados como V1 a V10 y seis variantes del VDENV-2, designados como V1 a V6. La variante más común de DENV-1 fue V8 (n = 46), el cual, fue aislado en Florida (EE. UU.), Managua (Nicaragua), Yucatán (México) y Quintana Roo (México). La variante más común de DENV-2 fue V4 (n = 86), el cual, fue aislado en Nicaragua, Colombia y Venezuela. Las variantes genéticas de DENV-1 y DENV-2 del presente estudio no fueron idénticas a ninguna otra secuencia en la base de datos de Genbank, por lo cual, se consideraron variantes genéticas únicas. Las secuencias más cercanas se muestran en el anexo 1.

El modelo de sustitución GTR + G fue seleccionado como el más apropiado para los datos ((ln L = 1094.7475; Delta-BIC = 1.3284; BIC = 2416.5963), con gamma de 1.3460. La secuencia de VDENV-1 obtenida del presente estudio (V2-DENV-1; Mex 2016) tuvo una estrecha relación filogenética con el VDENV-1 aislado en Brasil en 2015 con una distancia genética de 0,015. El soporte posterior fue 0,81 (Figura 10, Anexo 3). La secuencia de VDENV-2 del presente estudio (V2-DENV-2; Mex 2016) tuvo una estrecha relación filogenética con el VDENV-1 aislado en México en 2011 con una distancia genética de 0,020 (Figura 10, Anexo 4). El arreglo topológico fue compatible con una probabilidad posterior de 0,77 (Figura 10)

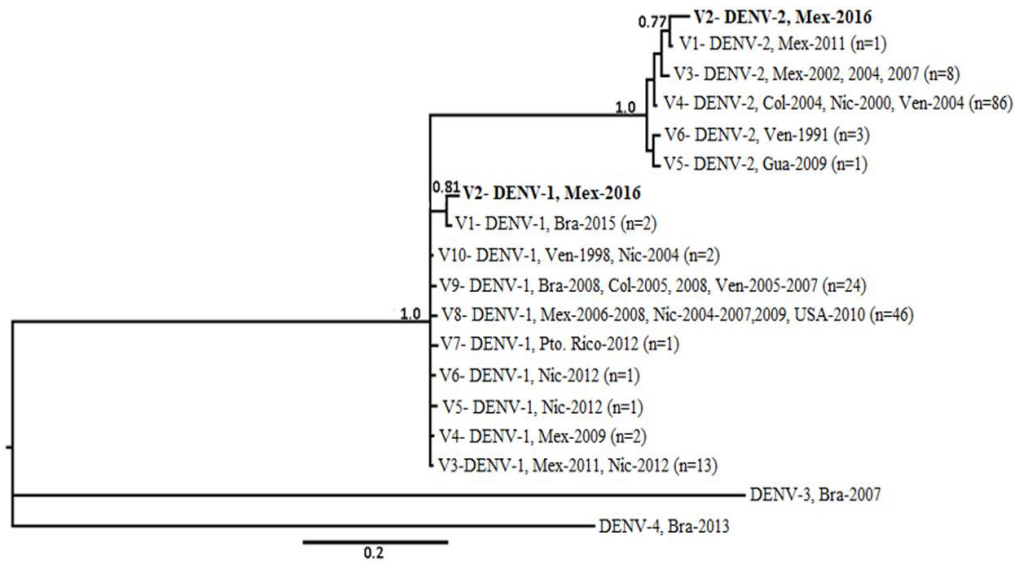


Figura 10. Análisis de Inferencia Bayesiana (IB) con el fragmento (204 nucleótido) del gen NS5 del virus dengue. Los números en cada rama (arriba de la rama) representan probabilidades posteriores obtenidas en el IB. VDENV-3 y VDENV-4 fueron usados como control. La barra de escala representa el número esperado de sustituciones de nucleótidos por sitio. Las variantes de cada serotipo se identifican con la letra V y con números arábigos. Letras en negrita representan a las variantes identificadas en el presente estudio.

### 6.10 Identificación del virus dengue y Zika en el cementerio y análisis filogenético

Fueron organizadas 1,648 hembras de *Ae. aegypti* en 166 grupos (pools). Ningún pool fue positivo al VCHIK. Por RT-PCR y secuenciación Sanguer fueron confirmados dos pools positivos. Un pool fue identificado con VDENV-1 y otro con el VZIK. La tasa mínima de infección fue 1.2. Los pools positivos fueron conformados por *Ae. aegypti* colectados en el día 13 (VDENV-1) y 17 (VZIK) durante la estimación del ciclo gonotrófico en temporada de lluvia (septiembre de 2016). En el presente trabajo, fue reportado evidencia de transmisión vertical del VDENV-1, porque el pool fue conformado por hembras nulíparas de *Ae. aegypti*.

La secuencia del VDENV-1 fue similar al VDENV-1 identificado en *Ae. aegypti* colectado de iglesias. La secuencia del virus del Zika fue comparada con 100 secuencias disponibles en el Genbank (Anexo 2). Las secuencias corresponden a 172 pares de bases y 56 aminoácidos del gen NS5. Fueron identificados seis variantes del VZIK (V1-V6). La secuencia del presente trabajo fue relacionada con la V2 (genotipo asiático) aislado de Guatemala (2015), México (2015-2016), China (2016), Honduras (2016),

Nicaragua (2016), Rusia (2016-2017) y Estados Unidos (2016-2017), con 98.3% de identidad de los nucleótidos. La alineación de las secuencias de aminoácidos reveló que tienen 100% de identidad y similitud. La distancia genética fue 0.018 (Anexo 5); a pesar de haber sitios polimórficos en la secuencia, no hubo cambios en la traducción a aminoácidos. La variante más común de VZIK fue la V2 (n = 80), seguido por V3 (17), el cual, fue aislado en El Salvador, China, México, Ecuador, Taiwán y Colombia. Esta última variante y V6 muestran sitios polimórficos y cambios en la traducción de la secuencia de aminoácido. Las transiciones excedieron las trans versiones por 3-1, respectivamente en 4 sustituciones para ambos (Anexo 6).

## 7. DISCUSIÓN

Con base en los resultados del trabajo, se determinó que las iglesias y el cementerio de la ciudad de Mérida, Yucatán, México, presentan criaderos productivos específicos para el desarrollo y sobrevivencia de los mosquitos; especialmente para *Ae. aegypti*. Además, se demostró la presencia de hembras de *Ae. aegypti* infectados naturalmente con el virus dengue y Zika.

Los hallazgos demostraron que, incluso a nivel local, los criaderos productivos cambian de acuerdo a las áreas residenciales y sitios públicos. En el presente trabajo, los criaderos más productivos para *Ae. aegypti* fueron las cubetas y los recipientes grandes ( $\geq 5L$ ) en iglesias. Mientras que, en el cementerio fueron los floreros. Adicionalmente, fueron estimados índices entomológicos en nivel de emergencia (índices  $> 5\%$ ), indicando acciones inmediatas para el tratamiento y/o eliminación de los criaderos (SSM 2017). Los resultados son similares con los reportados en Baja California Sur, México (Tovar-Zamora et al. 2015). Previamente fue reportado que, en casas de la ciudad de Mérida, Yucatán, los criaderos más comunes fueron los recipientes desechables (latas, bolsas de sabrita, bolsas de galletas, unice) (Winch et al. 1992; García-Rejón et al. 2011a). Mientras que, en terrenos baldíos fue identificado nueve especies de mosquitos en las llantas (Baak-Baak et al. 2014a). En los estacionamientos públicos, *Ae. aegypti* fue común encontrarlo en macetas (Baak-Baak et al. 2014b). Arana-Guardia y colaboradores (2014) reportaron que, las alcantarillas situadas a lo largo de calles y carreteras, son criaderos muy productivos durante todo el año. A diferencia del presente estudio, en iglesias de Monterrey, Nuevo León, los recipientes desechables fueron los criaderos más significativos de *Ae. aegypti* (Zarate-Nahon et al. 2013).

En Yucatán ha sido observado que las condiciones ambientales influyen en el tamaño de las poblaciones de los mosquitos. Durante la temporada de lluvia, aumentan los criaderos y como resultado aumenta el número de las etapas inmaduras de *Ae. aegypti* (García-Rejón et al. 2011a; Baak-Baak et al. 2014b). Este patrón estacional fue hallado en las iglesias, en el cual, se colectó cuatro veces más el número de larvas y pupas en la temporada de lluvia comparado con la temporada de secas. Este hallazgo está de acuerdo con el resultado de un estudio previo de la ciudad de Mérida. En

temporada de secas, se identificó que los criaderos productivos son aquellos abastecidos de agua por acción humana. Sin embargo, en el cementerio no hubo diferencia significativa entre el número de larvas y pupas colectadas por temporada. En temporada de secas, los floreros del cementerio probablemente fueron abastecidos de agua por acción humana, lo cual, posteriormente se convirtieron en criaderos de *Ae. aegypti*. En la ciudad de Mérida, se observó, que las macetas y los recipientes donde toman agua los animales son los criaderos comunes en temporada de secas, los cuales resultan de la adición de agua por acción humana (García-Rejón et al. 2011a). En contraste con estos hallazgos, en cementerios de Argentina, Filipinas y Venezuela, fue colectado mayor número de larvas y pupas en temporada de lluvias (Schultz 1989; Vezzani et al. 2001; Abe et al. 2005; Vezzani y Albicocco 2009). Otro resultado notable, es que, en ambos sitios de estudio, *Ae. aegypti* fue una especie dominante en los criaderos; especialmente en los cementerios. En este sitio, en el 92% de los floreros estuvo presente solo *Ae. aegypti*. Hallazgos similares fueron reportados en cementerios de Argentina, donde las especies dominantes fueron *Ae. aegypti* y *Cx. pipiens* (Vezzani y Albicocco 2009). Mientras que en Filipinas fue *Ae. aegypti* y *Ae. albopictus* (Schultz 1989). Por otra parte, en el cementerio de Mérida, Yucatán, fue hallado un promedio mensual de 15 floreros infestados de *Ae. aegypti*. Este promedio es alto, considerando que solo fue revisado un área de 100 m<sup>2</sup>. En Venezuela fue reportado un promedio de 39 criaderos de *Ae. aegypti* por hectárea (Abe et al. 2005).

En ambos sitios de estudio, fue mayor el número de mosquitos colectados en temporada de lluvia. Este patrón también fue observado cuando se analizó solo a las hembras de *Ae. aegypti*, aunque el estado trófico cambió drásticamente entre sitios. En iglesias fue capturado mayor número de hembras alimentadas, principalmente del interior y en las oficinas. Mientras que, en el cementerio el 80.52% de las hembras de *Ae. aegypti* fueron registradas como no alimentadas. Estudios previos señalaron que las hembras de *Ae. aegypti* con visible sangre en el abdomen fueron colectadas de ambientes interiores. Por ejemplo, en casas son colectadas usualmente en el dormitorio y salas de estar (García-Rejón et al. 2008). En escuelas, los salones de clase y las oficinas son los lugares propicios para las hembras alimentadas de *Ae. aegypti* (García-Rejón et al. 2011b; Olano et al. 2015). Probablemente, porque son lugares donde los humanos

pasan mayor parte del tiempo y además estos lugares usualmente tienen poca luz y les permite reposar después de la alimentación sanguínea. Por su parte, Zarate-Nahon y colaboradores (2013), señalaron que *Ae. aegypti* fue colectado comúnmente de los baños de sitios públicos en Monterrey, Nuevo León, aunque no registraron su estado trófico.

El ciclo gonotrófico y la sobrevivencia de *Ae. aegypti* son parámetros importantes de la capacidad vectorial del mosquito. Intervalos cortos entre comidas sanguíneas y postura de huevos, aumenta la frecuencia de contacto con los humanos y, por ende, aumenta el riesgo de transmisión de arbovirus. Estudios previos sobre el ciclo gonotrófico de *Ae. aegypti* han demostrado que el mosquito tiene un rango amplio de tiempo. El ciclo gonotrófico más largo para *Ae. aegypti* fue estimado en ocho días a 24 °C en condiciones de laboratorio (Goindin et al. 2015) y siete días en hembras nulíparas (Trpis y Hausermann 1986) y hembras alimentadas con una dieta mixta de sangre humana y miel (Morrison et al. 1999). En el presente estudio, tanto en iglesias como en el cementerio, fue estimado un ciclo gonotrófico de cuatro y tres días en temporada de lluvias y secas, respectivamente. Este resultado fue confirmado por el desarrollo oogénico del mosquito basado en la evidencia del análisis de la vitelogénesis, donde se observó que las hembras alcanzaron la maduración del huevo (estado de Christopher's V) a las 3.5 a 3.25 días en temporada de lluvias y secas, respectivamente. El ciclo gonotrófico de cuatro días en los sitios públicos fue comparable con estudios realizados con el método de marcaje-liberación-recaptura en Tailandia (Pant y Yasuno 1973), Tanzania (Conway et al. 1974) y Kenia (Trpis y Hausermann 1986). En Jalisco y Nuevo León, México, fue estimado un ciclo gonotrófico de cinco días en *Ae. aegypti* durante la temporada de lluvias (Salas-Luevano 1993; Patiño-Beltrán 2001). La diferencia de un día de retraso del ciclo gonotrófico con nuestro estudio, probablemente ocurrió por las bajas temperaturas (21.5 y 25.5 °C) de los sitios de estudio. Por otra parte, el ciclo gonotrófico de tres días en temporada de secas fue afectado por las altas temperaturas durante el estudio (29.8°C). En condiciones de laboratorio fue observado que temperaturas altas de 30°C favorecieron ciclos gonotróficos cortos (Goindin et al. 2015). El resultado, está de acuerdo con reportes previos de tres días en Tailandia (Sheppard et al. 1969), el Este de África (McClelland y Conway 1971) y Perú (Wong et al. 2011). En la ciudad de Mérida, fue realizado un estudio en casas donde fue estimado un ciclo

gonotrófico de siete días en *Ae. aegypti*. Por otra parte, el resultado del presente trabajo, es similar con el ciclo gonotrófico de *Cx. quinquefasciatus*, en el cual, fue estimado cuatro y tres días en temporada de lluvia y secas, respectivamente (García-Rejón et al. 2008). En trabajos previos, fue usado el método de cebo humano para colectar a *Ae. aegypti* en los estudios de ciclo gonotrófico. Actualmente, las comisiones de ética y bioseguridad no permiten este método, por lo cual, usamos aspiradores de mochila en iglesias y trampas centinela en cementerios y se obtuvieron resultados satisfactorios. Por lo cual, recomendamos usar esta metodología para futuros estudios sobre ciclo gonotrófico de mosquitos.

Índices altos de sobrevivencia diaria aumentan el riesgo de transmisión de patógenos (Holmes y Birley 1987). En condiciones de laboratorio, altos valores de sobrevivencia (0.84) fue estimado a 27 °C, en el cual, alcanzaron hasta 25 días de vida (Goindín et al. 2015). Este resultado fue similar con el presente trabajo. En ambos sitios de estudio y entre temporada, fue estimado sobrevivencia diaria mínima de 0.83 en cementerio y 0.93 en las iglesias, con rango de temperatura de 26.7 y 29.8 °C. Otros estudios han estimado los índices de sobrevivencias diaria de *Ae. aegypti*, por ejemplo, en Tailandia fue reportado 0.81 (Sheppard et al. 1969), en Tanzania fue 0.85 (Conway et al. 1974) y en Kenia fue 0.83 (Trpis y Hausermann 1986). En México, los índices de sobrevivencia de *Ae. aegypti* fue reportado por Salas-Luevano (1993), quien estimó un índice 0.87, Rebollar-Téllez y colaboradores (1995) estimaron el índice de 0.86, y Patiño-Beltrán (2001) en 0.91. Debido al corto tiempo entre dos alimentaciones sanguíneas consecutivas de *Ae. aegypti* en iglesias y el cementerio de Mérida, se puede inferir que los mosquitos entran en contacto con los humanos cada tres y cuatro días en temporada de secas y lluvia, respectivamente.

Todas las hembras de *Ae. aegypti* analizadas se alimentaron del huésped humano. Esto concuerda con su comportamiento de alimentación, donde se ha observado que se alimenta principalmente de humanos (Scott et al. 1993) y menos frecuente en perros, gatos y pollos (Barrera et al. 2012; Harrington et al. 2014). Cabe destacar que el 71.62% de los mosquitos alimentados fueron colectados del interior de la iglesia. EL comportamiento endofílico ha sido reportado previamente (Scott et al. 2000; García-Rejón et al. 2008). En casas de la ciudad de Mérida, la mayoría de las hembras de *Ae.*

*aegypti* fueron colectados en las recamaras y en las salas (García-Rejón et al. 2008). En escuelas, es común encontrarlas en los salones y las oficinas (García-Rejón et al. 2011b; Olano et al. 2015). Mientras que, en iglesias de Monterrey, Nuevo León, fue común encontrar a *Ae. aegypti* en los baños. Entre las limitaciones del presente estudio, fue que se utilizó un subconjunto de mosquitos (con alimentación reciente) para determinar la preferencia del huésped y no se identificó comidas múltiples de *Ae. aegypti*. Sin embargo, como se señaló anteriormente, aproximadamente el 90% de la alimentación sanguínea del mosquito provienen de un único huésped (humano) (Scott et al. 1993).

Los hallazgos del presente estudio, proporciona evidencia de que las iglesias y el cementerio de Mérida, Yucatán, México representan un riesgo epidemiológico para los seres humanos debido a que fue encontrado ARN del virus dengue y Zika en *Ae. aegypti*. En la iglesia de Vergel III situada al oriente de la ciudad, se encontró dos pools positivos con VDEN. El DEN-1 fue identificado de mosquitos colectados dentro de la iglesia y el DEN-2 en mosquitos colectados dentro de una bodega. Estudios previos también reportaron a *Ae. aegypti* infectado con el VDEN y VCHIK en casas y escuelas de esta área de la ciudad (García-Rejón et al. 2008, 2011b, Loroño-Pino et al. 2013; Eisen et al. 2014; Cigarroa-Toledo et al. 2016). Cabe destacar, que poblaciones de *Ae. aegypti* colectadas en la colonia Vergel III han sido reportadas con los genes Ile1,016 y Cys1,534 asociados a la resistencia a piretroides (Saavedra-Rodríguez et al. 2015; Vera-Maloof et al. 2015). Por lo tanto, se requiere un mayor control del vector en esta región. Una forma de lograr este objetivo es a través de una mayor intervención comunitaria. En este estudio, a los trabajadores de la iglesia se les proporcionó información sobre el ciclo de vida de los mosquitos, sus criaderos y su papel en la transmisión de arbovirus. También se recomendó a los visitantes de la iglesia el uso de protección personal contra los mosquitos (por ejemplo, repelentes).

La tasa mínima de infección en las iglesias fue 1.5, el cual, es considerablemente más bajo que el 4.6 reportado en las escuelas en Mérida (García-Rejón et al. 2011b). Sin embargo, nuestros resultados son similares con estudios previos realizados en casas de pacientes con dengue (García-Rejón et al. 2008; Eisen et al. 2014). Por otra parte, la tasa mínima de infección en el cementerio fue 1.2. Este valor fue menor comparado con estudio realizados en México. En Chiapas, Guerbois y colaboradores (2016) reportaron

la TMI de 32. Mientras que en San Luis Potosí, Huerta y colaboradores (2017) reportaron un TMI de 42.

Los estudios filogenéticos han demostrado que los virus del dengue pueden moverse largas distancias entre continentes y distancias cortas entre países vecinos (Rico-Hesse 2003). En las Américas, el dengue tiene un patrón epidémico con brotes que ocurren generalmente cada 3 a 5 años como resultado de la introducción de variantes genéticamente distintas (Brathwaite et al. 2012). Un análisis filogenético realizado con secuencias completas del gen de la envoltura del VDEN reveló que ha habido múltiples introducciones de nuevas variantes de los cuatro serotipos en México (1980-2007) y que los virus eran similares a los que circulan en otras partes de las Américas (Carrillo-Valenzo et al. 2010). Las secuencias del gen NS5 también han sido usadas para evaluar las relaciones genéticas intraespecíficas entre los aislados de DENV. Por ejemplo, se reveló que existe una estrecha relación genética entre el VDEN aislado en Ecuador y el Caribe (Regato et al. 2008).

Con el análisis filogenético, las secuencias de gen NS5 de VDEN-1, VDEN-2 y VZIK, fueron agrupadas en variantes genéticas. Estas fueron alineadas y comparadas con otras secuencias depositadas en el Genbank y ninguna variante fue parecida. Lo que sugiere que las variantes identificadas en el presente estudio son variantes nuevas. Sin embargo, en la figura 10 se puede observar que la variante 2 del presente estudio (V2-DEN-Mix-2016) estuvo relacionada con la variante 5 (V5-DEN-2-Gua) aislado de un paciente en Guatemala en el 2009. Esta variante genética, pertenece al genotipo asiático/americano. Dicho genotipo, está asociado con el dengue severo. EL genotipo asiático/americano pertenece al serotipo 2 del dengue y fue identificado en Yucatán en un brote de dengue en el 2002 (Loroño-Pino et al. 2004). Por otra parte, en Yucatán solo había sido reportado el VZIK en humanos (Díaz-Quñones et al. 2016). Este es el primer estudio que reporta el ARN del VZIK en *Ae. aegypti*.

Además de *Ae. aegypti*, fueron identificados otros mosquitos implicados en la transmisión de arbovirus como son *Cx. quinquefasciatus*, *Cx. interrogator*, *Cx. nigripalpus*, *Cx. stigmatosoma* y *Cx. thriambus*. Los cuales, son vectores competentes del Virus del Oeste Nilo (VON) y el virus de la encefalitis de San Luis (Reisen et al. 2006, Richards et al. 2012). En Nuevo León, México, el VON fue aislado en *Cx.*

*quinquefasciatus* (Elizondo-Quiroga et al. 2005). Este mosquito fue muy abundante en la colecta de las iglesias. El VON también ha sido identificado en *Cx. nigripalpus* y *Cx. interrogador* en Chiapas, México (Ulloa et al. 2009). En Veracruz fue identificado el virus de la encefalitis equina venezolana en *Cx. coronador* (Scherer et al. 1971). En Yucatán, varios Orthobunyavirus (virus Cache Valley, Cholul, South River y Kairi) fueron aislados en *Ae. taeniorhynchus* (Farfán-Ale et al. 2009, 2010). Por lo tanto, es importante que los esfuerzos de control de mosquitos en Mérida no se centren únicamente en *Ae. aegypti*.

## 8. CONCLUSIONES

- En las iglesias fueron colectados cuatro veces más larvas y pupas de *Ae. aegypti* en temporada de lluvia comparado con la temporada de secas.
- En el cementerio, la temporalidad no fue significativo en el número de larvas y pupas colectadas. En lluvias, solo se colectó 1.6 veces más larvas y pupas.
- Las cubetas y los recipientes desechables fueron los criaderos productivos para *Ae. aegypti* en las iglesias. Mientras que, en el cementerio, los floreros fueron los únicos criaderos productivos.
- En ambos sitios de estudio, la abundancia de *Ae. aegypti* fue mayor en la temporada de lluvias. Aunque el estado trófico fue diferente. En las iglesias fue colectado mayor número de hembras alimentadas y en el cementerio fue mayor el número de hembras no alimentadas.
- En ambos sitios de estudio, la duración del ciclo gonotrófico fue de tres días en temporada de secas y cuatro días en temporada de lluvias.
- En las iglesias, el 100% de las hembras de *Ae. aegypti* analizadas fueron identificadas con sangre de humano.
- Fue encontrado RNA del VDEN y VZIK en *Ae. aegypti*, lo cual, implica riesgo de transmisión de arbovirus en los humanos que visitan las iglesias y el cementerio y también para los que viven cerca de estos sitios.

## 9. LITERATURA CITADA

- Abe M, PJ McCall, A Lenhart, E Villegas, A Kroeger. 2005. The Buen Pastor cemetery in Trujillo, Venezuela: measuring dengue vector output from a public area. *Tropical Medicine & International Health*. 10: 597-603.
- Apostol BL, WC IV Black, P Reiter, BR Miller. 1994. Use of randomly amplified polymorphic DNA amplified by polymerase chain reaction markers to estimate the number of *Aedes aegypti* families at oviposition sites in San Juan, Puerto Rico. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 51: 89-97.
- Arana-Guardia R, CM Baak-Baak, MA Loroño-Pino, C Machain-Williams, BJ Beaty, L Eisen, JE García-Rejón. 2014. Stormwater drains and catch basins as sources for production of *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus*. *Acta tropica*. 134: 33-42.
- Arredondo-Jiménez JI, KM Valdez-Delgado. 2006. *Aedes aegypti* pupal/demographic surveys in southern Mexico: consistency and practicality. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*. 100 Suppl 1: S17-S32.
- Baak-Baak CM, R Arana-Guardia, N Cigarroa-Toledo, MA Loroño-Pino, G Reyes-Solis, C Machain-Williams, BJ Beaty, L Eisen, JE García-Rejón. 2014a. Vacant lots: productive sites for *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Diptera: Culicidae) in Merida City, Mexico. *Journal of Medical Entomology*. 51: 475-483.
- Baak-Baak CM, R Arana-Guardia, N Cigarroa-Toledo, M Puc-Tinal, C Coba-Tun, V Rivero-Osorno, D Lavallo-Kantun, MA Loroño-Pino, C Machain-Williams, GC Reyes-Solís, BJ Beaty, L Eisen, JE García-Rejón. 2014b. Urban Mosquito Fauna in Merida City, Mexico: Immatures Collected from Containers and Storm-water Drains/Catch Basins. *Southwestern Entomologist*. 39: 291-306.
- Barker-Hudson P, R Jones, BH Kay. 1988. Categorization of domestic breeding habitats of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) in Northern Queensland, Australia. *Journal of Medical Entomology*. 25: 178-182.
- Barrera R, M Amador, GG Clark. 2006a. Use of the pupal survey technique for measuring *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) productivity in Puerto Rico. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 74: 290-302.

- Barrera R, M Amador, GG Clark. 2006b. Ecological factors influencing *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) productivity in artificial containers in Salinas, Puerto Rico. *Journal of Medical Entomology*. 43: 484-492.
- Barrera R, M Amador, AJ MacKay. 2011. Population dynamics of *Aedes aegypti* and dengue as influenced by weather and human behavior in San Juan, Puerto Rico. *PLoS One*. 5: e1378.
- Barrera R, M Amador, A Diaz, J Smith, JL Muñoz-Jordan, Y Rosario. 2008. Unusual productivity of *Aedes aegypti* in septic tanks and its implications for dengue control. *Medical and Veterinary Entomology*. 22: 62-69.
- Barrera R, AM Bingham, HK Hassan, M Amador, AJ Mackay, TR Unnasch. 2012. Vertebrate Hosts of *Aedes aegypti* and *Aedes mediiovittatus* (Diptera: Culicidae) in Rural Puerto Rico. *Journal of Medical Entomology*. 49: 917-921.
- Bhatt S, PW Gething, OJ Brady, JP Messina, AW Farlow, CL Moyes, JM Drake, JS Brownstein, AG Hoen, O Sankoh, MF Myers, DB George, T Jaenisch, GR Wint, CP Simmons, TW Scott, JJ Farrar, SI Hay. 2013. The global distribution and burden of dengue. *Nature*. 496: 504-507.
- Birley MH, PK Rajagopalan. 1981. Estimation of the survival and biting rates of *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). *Journal of Medical Entomology*. 18: 181-186.
- Bockarie MJ, MW Service, G Barnish, YT Toure. 1995. Vectorial capacity and entomological inoculation rates of *Anopheles gambiae* in a high rainfall forested area of southern Sierra Leone. *Tropical Medicine and Parasitology*. 46: 164-171.
- Braks MA, NA Honorio, R Lourenco-de-Oliveira, SA Juliano, LP Lounibos. 2003. Convergent habitat segregation of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in southeastern Brazil and Florida. *Journal of Medical Entomology*. 40: 785-794.
- Brathwaite O, J San Martín, RH Montoya, J del Diego, B Zambrano, GH Dayan. 2012. The history of dengue outbreaks in the Americas. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 87: 584-593.
- Briegel H. 1990. Metabolic relationship between female body size, reserves, and fecundity of *Aedes aegypti*. *Journal Insect Physiology*. 36: 165-172.

- Brown JE, BR Evans, W Zheng, V Obas, L Barrera-Martinez, A Egizi, H Zhao, A Caccone, JR Powell. 2013. Human Impacts Have Shaped Historical and Recent Evolution in *Aedes Aegypti*, the Dengue and Yellow Fever Mosquito. *Evolution*. 68 (2):514-25.
- Burke R, R Barrera, M Lewis, T Kluchinsky, D Claborn. 2010. Septic tanks as larval habitats for the mosquitoes *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus* in Playa-Playita, Puerto Rico. *Medical and Veterinary Entomology* 24: 117-123.
- Carpenter SJ, WJ LaCasse. 1965. Mosquitoes of North America (North of Mexico), University of California Press, Berkeley, CA.
- Carrillo-Valenzo E, R Danis-Lozano, JX Velasco-Hernández, G Sánchez-Burgos, C Alpuche, I López, C Rosales, C Baronti, X de Lamballerie, EC Holmes, J Ramos-Castaneda. 2010. Evolution of dengue virus in Mexico is characterized by frequent lineage replacement. *Archives of Virology*. 155: 1401-1412.
- Cigarroa-Toledo N, BJ Blitvich, RC Cetina-Trejo, LG Talavera-Aguilar, CM Baak-Baak, OM Torres-Chable, MN Hamid, I Friedberg, P Gonzalez-Martinez, G Alonzo-Salomon, EP Rosado-Paredes, N Rivero-Cardenas, GC. Reyes-Solis, JA Farfán-Ale, JE García-Rejón, C Machain-Williams. 2016. Chikungunya Virus in Febrile Humans and *Aedes aegypti* Mosquitoes, Yucatan, Mexico. *Emerging Infectious Diseases*. 22: 1804-1807.
- Conway G, M Trpis, G McClelland. 1974. Population parameters of the mosquito *Aedes aegypti* (L.) estimated by mark-release-recapture in a suburban habitat in Tanzania. *The Journal of Animal Ecology*. 289-304.
- Corona ME, JAL de la Garza-Barroso, JCR Martínez, NIL Guzmán, CR Matus, JAD Quiñonez, IL Martínez, PAK Morales. 2016. Clinical and epidemiological characterization of laboratory-confirmed autochthonous cases of Zika virus disease in Mexico. *PLoS Curr*. doi: 10.1371/currents.outbreaks.a2fe1b3d6d7.
- Costa F, G Fattore, M Abril. 2012. Diversity of containers and buildings infested with *Aedes aegypti* in Puerto Iguazu, Argentina. *Cadernos de Saude Publica*. 28: 1802-1806.

- Costa FS, JJ Silva, CM Souza, J Mendes. 2008. Population dynamics of *Aedes aegypti* (L) in an urban area with high incidence of dengue. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 41: 309-312.
- Cox J, ME Grillet, OM Ramos, M Amador, R Barrera. 2007. Habitat segregation of dengue vectors along an urban environmental gradient. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 76: 820-826.
- Cunha MS, DLA Esposito, IM Rocco, AY Maeda, FGS Vasami, JS Nogueira, RP de Souza, A Suzuki, M Addas-Carvalho, ML Barjas-Castro. 2016. First complete genome sequence of Zika virus (Flaviviridae, Flavivirus) from an autochthonous transmission in Brazil. *Genome Announcements*. 4: e00032-00016.
- Chadee DD. 2004. Key premises, a guide to *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) surveillance and control. *Bulletin of Entomological Research*. 94: 201-207.
- Chadee DD, R Martinez. 2000. Landing periodicity of *Aedes aegypti* with implications for dengue transmission in Trinidad, West Indies. *Journal of Vector Ecology*. 25: 158-163.
- Chambers TJ, CS Hahn, R Galler, CM Rice. 1990. Flavivirus genome organization, expression, and replication. *Annual Review of Microbiology*. 44: 649-688.
- Chang MC, HJ Teng, CF Chen, YC Chen, CR Jeng. 2008. The resting sites and blood-meal sources of *Anopheles minimus* in Taiwan. *Malaria Journal* 7: 105.
- Christophers SR. 1960. *Aedes aegypti* (L.) the Yellow Fever Mosquito: its Life History, Bionomics and Structure. Cambridge University Press. Cambridge.
- Dantes HG, JA Farfán-Ale, E Sarti. 2014. Epidemiological trends of dengue disease in Mexico (2000-2011): a systematic literature search and analysis. *PLoS One*. 8: e3158.
- Darsie RFJ, RA Ward. 2005. Identification and Geographical Distribution of the Mosquitoes of North America, North of Mexico. University Press of Florida, Gainesville, FL.
- de Alba-García JEG, AL Salcedo-Rocha. 2002. Fiebre amarilla en México, hace 120 años. *Cirugía y Cirujanos* 70: 116-123.

- de la Mora-Covarrubias A, F Jiménez-Vega, SM Trevino-Aguilar. 2010. Geospatial distribution and detection of dengue virus in *Aedes (Stegomyia) aegypti* mosquitos in Ciudad Juarez, Chihuahua, Mexico. *Salud Publica de Mexico*. 52: 127-133.
- Detinova TS. 1962. Age-grouping methods in Diptera of medical importance, with special reference to some vectors of malaria. Monograph series. World Health Organization. 47:13–191
- Diaz-Gonzalez EE, TF Kautz, A Dorantes-Delgado, IR Malo-García, M Laguna-Aguilar, RM Langsjoen, R Chen, DI Auguste, RM Sánchez-Casas, R Danis-Lozano, SC Weaver, I Fernández-Salas. 2015. First Report of *Aedes aegypti* Transmission of Chikungunya Virus in the Americas. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 93: 1325-1329.
- Diaz-Quinonez JA, I López-Martínez, B Torres-Longoria, M Vázquez-Pichardo, E Cruz-Ramírez, JE Ramírez-González, C Ruiz-Matus, P Kuri-Morales. 2016. Evidence of the presence of the Zika virus in Mexico since early 2015. *Virus Genes*. 52: 855-857.
- Díaz-Quñones JA, N Escobar-Escamilla, C Wong-Arámbula, M Vázquez-Pichardo, B Torres-Longoria, I López-Martínez, C Ruiz-Matus, P Kuri-Morales, JE Ramírez-González. 2016. Asian genotype Zika virus detected in traveler returning to Mexico from Colombia, October 2015. *Emerging Infectious Diseases*. 22: 937.
- Dick G, S Kitchen, A Haddow. 1952. Zika virus (I). Isolations and serological specificity. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 46: 509-520.
- Dieng H, RG Saifur, AH Ahmad, MC Salmah, AT Aziz, T Satho, F Miake, Z Jaal, S Abubakar, RE Morales. 2012. Unusual developing sites of dengue vectors and potential epidemiological implications. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 2: 228-232.
- Dos Reis IC, NA Honorio, CT Codeco, A Magalhaes Mde, R Lourenco-de-Oliveira, C Barcellos. 2010. Relevance of differentiating between residential and non-residential premises for surveillance and control of *Aedes aegypti* in Rio de Janeiro, Brazil. *Acta Tropica*. 114: 37-43.

- Dzul-Manzanilla F, NE Martínez, M Cruz-Nolasco, C Gutiérrez-Castro, L López-Damián, J Ibarra-López, A Martini-Jaimes, W Bibiano-Marín, C Tornez-Benitez, GM Vázquez-Prokopec. 2015. Evidence of vertical transmission and co-circulation of chikungunya and dengue viruses in field populations of *Aedes aegypti* (L.) from Guerrero, Mexico. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. 110: 141-144.
- Edman JD, TW Scott, A Costero, AC Morrison, LC Harrington, GG Clark. 1998. *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) movement influenced by availability of oviposition sites. Journal of Medical Entomology. 35: 578-583.
- Eisen L, JE García-Rejón, S Gómez-Carro, R Nájera-Vázquez, TJ Keefe, BJ Beaty, MA Loroño-Pino. 2014. Temporal correlations between mosquito-based dengue virus surveillance measures or indoor mosquito abundance and dengue case numbers in Merida City, Mexico. Journal of Medical Entomology. 51: 885-890.
- Elizondo-Quiroga D, CT Davis, I Fernández-Salas, R Escobar-López, DV Olmos, LCS Gastalum, MA Acosta, A Elizondo-Quiroga, JI González-Rojas, JFC Cordero, H Guzmán, A Travassos da Rosa, BJ Blitvich, ADT Barrett, BJ Beaty, RB Tesh. 2005. West Nile Virus Isolation in Human and Mosquitoes, Mexico. Emerging Infectious Diseases. 11: 1449-1452.
- Farfán-Ale JA, MA Loroño-Pino, JE García-Rejón, V Soto, M Lin, M Staley, KS Dorman, LC Bartholomay, E Hovav, BJ Blitvich. 2010. Detection of flaviviruses and orthobunyaviruses in mosquitoes in the Yucatan Peninsula of Mexico in 2008. Vector-Borne and Zoonotic Diseases. 10: 777-783.
- Farfán-Ale JA, MA Loroño-Pino, JE García-Rejón, E Hovav, AM Powers, M Lin, KS Dorman, KB Platt, LC Bartholomay, V Soto, BJ Beaty, RS Lanciotti, BJ Blitvich. 2009. Detection of RNA from a novel West Nile-like virus and high prevalence of an insect-specific flavivirus in mosquitoes in the Yucatan Peninsula of Mexico. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. 80: 85-95.
- Favier C, N Degallier, T Vilarinhos, S de Carvalho, MA Yoshizawa, MB Knox. 2006. Effects of climate and different management strategies on *Aedes aegypti* breeding sites: a longitudinal survey in Brasilia (DF, Brazil). Tropical Medicine & International Health. 1104-1118.

- Figueiredo ML, HL Alfonso, AA Amarilla, LT Figueiredo, VH Aquino, CA Costa, SL Luz. 2013. Detection of DENV-4 genotype I from mosquitoes collected in the city of Manaus, Brazil. *Virology Journal*. 10: 60.
- Figueiredo MLG, LTM Figueiredo. 2014. Emerging alphaviruses in the Americas: Chikungunya and Mayaro. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 47: 677-683.
- Fischer M, JE Staples. 2014. Notes from the field: chikungunya virus spreads in the Americas—Caribbean and South America, 2013–2014. *MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report* 63: 500-501.
- Focks DA, DD Chadee. 1997. Pupal survey: an epidemiologically significant surveillance method for *Aedes aegypti*: an example using data from Trinidad. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 56: 159-167.
- García-Rejón JE, MA Loroño-Pino, JA Farfán-Ale, L Flores-Flores, E del Pilar Rosado-Paredes, N Rivero-Cárdenas, R Nájera-Vázquez, S Gómez-Carro, V Lira-Zumbardo, P González-Martínez, S Lozano-Fuentes, D Elizondo-Quiroga, BJ Beaty, L Eisen. 2008. Dengue virus-infected *Aedes aegypti* in the home environment. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 79: 940-950.
- García-Rejón JE, MP López-Uribe, MA Loroño-Pino, JA Farfán-Ale, MR Nájera-Vázquez, S Lozano-Fuentes, BJ Beaty, L Eisen. 2011a. Productive container types for *Aedes aegypti* immatures in Merida, Mexico. *Journal of Medical Entomology*. 48: 644-650.
- García-Rejón JE, MA Loroño-Pino, JA Farfán-Ale, LF Flores-Flores, MP López-Uribe, R. Nájera-Vázquez, G Nuñez-Ayala, BJ Beaty, L Eisen. 2011b. Mosquito infestation and dengue virus infection in *Aedes aegypti* females in schools in Merida, Mexico. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 84: 489-496.
- García-Rejón JE, MP López-Uribe, MA Loroño-Pino, R Arana-Guardia, M Puc-Tinal, GM López-Uribe, C Coba-Tun, CM Baak-Baak, C Machain-Williams, GC Reyes-Solis, S Lozano-Fuentes, K Saavedra-Rodriguez, WC IV Black, BJ Beaty, L Eisen. 2012. *Aedes (Stegomyia) aegypti* and *Aedes (Howardina) cozumelensis* in

- Yucatan State, Mexico, with a summary of published collection records for *Ae. cozumelensis*. *Journal of Vector Ecology*. 37: 365-372.
- García-Rejón JE, JA Farfán-Ale, A Ulloa, LF Flores-Flores, E Rosado-Paredes, CM Baak-Baak, MA Loroño-Pino, I Fernández-Salas, BJ Beaty. 2008. Gonotrophic cycle estimate for *Culex quinquefasciatus* in Merida, Yucatan, Mexico. *Journal of the American Mosquito Control Association*. 24: 344-348.
- Glasser CM, B Arduino, GL Barbosa, RM Ciaravolo, F Domingos, CD Oliveira, M Pereira, M Silva, AM Trevisan. 2011. Behavior of immatures *Aedes aegypti* in the coast State of Sao Paulo, Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 44: 349-355.
- Goindin D, C Delannay, C Ramdini, J Gustave, F Fouque. 2015. Parity and longevity of *Aedes aegypti* according to temperatures in controlled conditions and consequences on dengue transmission risks. *PloS One*. 10: e0135489.
- Guerbois M, I Fernández-Salas, SR Azar, R Danis-Lozano, CM Alpuche-Aranda, G Leal, IR García-Malo, EE Diaz-González, M Casas-Martínez, SL Rossi. 2016. Outbreak of Zika virus infection, Chiapas State, Mexico, 2015, and first confirmed transmission by *Aedes aegypti* mosquitoes in the Americas. *The Journal of Infectious Diseases*. 214: 1349-1356.
- Guzman MG, SB Halstead, H Artsob, P Buchy, J Farrar, DJ Gubler, E Hunsperger, A Kroeger, HS Margolis, E Martinez, MB Nathan, JL Pelegriño, C Simmons, S Yoksan, RW Peeling. 2010. Dengue: a continuing global threat. *Nature Reviews. Microbiology*. 8: S7-16.
- Hadow A, M Williams, J Woodall, D Simpson, L Goma. 1964. Twelve isolations of Zika virus from *Aedes (Stegomyia) africanus* (Theobald) taken in and above a Uganda forest. *Bulletin of the World Health Organization*. 31: 57.
- Hall T. 2011. BioEdit: an important software for molecular biology. *GERF Bull Biosci* 2: 60-61.
- Harrington LC, A Fleisher, D Ruiz-Moreno, F Vermeulen, CV Wa, RL Poulson, JD Edman, JM Clark, JW Jones, S Kitthawee, TW Scott. 2014. Heterogeneous feeding patterns of the dengue vector, *Aedes aegypti*, on individual human hosts in rural Thailand. *PLoS One*. 8: e3048.

- Holmes P, M Birley. 1987. An improved method for survival rate analysis from time series of haematophagous dipteran populations. *The Journal of Animal Ecology*. 427-440.
- Huerta H, JF González-Roldán, G Sánchez-Tejeda, F Correa-Morales, FE Romero-Contreras, R Cárdenas-Flores, ML Rangel-Martínez, JM Mata-Rivera, JJ Siller-Martínez, GM Vázquez-Prokopec. 2017. Detection of Zika virus in *Aedes* mosquitoes from Mexico. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*: 1-4.
- Ibáñez-Bernal S, B Briseño, JP Mutebi, E Argot, G Rodríguez, C Martínez-Campos, RP de la Fuente-San Roman, R Tapia-Conyer, A Flisser. 1997. First record in America of *Aedes albopictus* naturally infected with dengue virus during the 1995 outbreak at Reynosa, Mexico. *Medical and Veterinary Entomology*. 11: 305-309.
- Kautz TF, EE Díaz-González, JH Erasmus, IR Malo-García, RM Langsjoen, EI Patterson, DI Auguste, NL Forrester, RM Sanchez-Casas, M Hernández-Ávila. 2015. Chikungunya virus as cause of febrile illness outbreak, Chiapas, Mexico, 2014. *Emerging Infectious Diseases*. 21: 2070.
- Kay BH, PA Ryan, BM Russell, JS Holt, SA Lyons, PN Foley. 2000. The importance of subterranean mosquito habitat to arbovirus vector control strategies in north Queensland, Australia. *Journal of Medical Entomology*. 37: 846-853.
- Khan AH, K Morita, M del Carmen Parquet, F Hasebe, EG Mathenge, A Igarashi. 2002. Complete nucleotide sequence of chikungunya virus and evidence for an internal polyadenylation site. *Journal of General Virology* 83: 3075-3084.
- Knox TB, YT Nguyen, NS Vu, BH Kay, PA Ryan. 2010. Quantitative relationships between immature and emergent adult *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) populations in water storage container habitats. *Journal of Medical Entomology*. 47: 748-758.
- Kumar S, G Stecher, K Tamura. 2016. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular biology and evolution*. 33: 1870-1874.
- Kyle JL, E Harris. 2008. Global spread and persistence of dengue. *Annual Review of Microbiology*. 62: 71-92.

- Leisnham PT, SA Juliano. 2009. Spatial and temporal patterns of coexistence between competing *Aedes* mosquitoes in urban Florida. *Oecologia*. 160: 343-352.
- Librado P, J Rozas. 2009. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics (Oxford, England)* 25: 1451-1452.
- Liebman KA., ST Stoddard, RC Reiner Jr, TA Perkins, H Astete, M Sihuincha, ES Halsey, TJ Kochel, AC Morrison, TW Scott. 2014. Determinants of heterogeneous blood feeding patterns by *Aedes aegypti* in Iquitos, Peru. *PLoS One*. 8: e2702.
- Lopes J, MA da Silva, AM Borsato, VD de Oliveira, FJ Oliveira. 1993. *Aedes (Stegomyia) aegypti* L. and associated culicidae fauna in a urban area of southern Brazil. *Revista da Saude Publica*. 27: 326-333.
- Loroño-Pino MA, JA Farfán-Ale, AL Zapata-Peraza, EP Rosado-Paredes, LF Flores-Flores, JE García-Rejón, FJ Díaz, BJ Blitvich, M Andrade-Narvaez, E Jiménez-Ríos. 2004. Introduction of the American/Asian genotype of dengue 2 virus into the Yucatan State of Mexico. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 71: 485-492.
- Loroño-Pino MA, JE García-Rejón, C Machain-Williams, S Gomez-Carro, G Nunez-Ayala, R Nájera-Vázquez, A Losoya, L Aguilar, K Saavedra-Rodriguez, S Lozano-Fuentes, MK Beaty, WC IV Black, TJ Keefe, L Eisen, BJ Beaty. 2013. Towards a Casa Segura: a consumer product study of the effect of insecticide-treated curtains on *Aedes aegypti* and dengue virus infections in the home. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 89: 385-397.
- Loroño-Pino MA, JA Farfán-Ale, EP Rosado Paredes, G Kuno, DJ Gubler. 1993. Epidemic dengue 4 in the Yucatan, Mexico, 1984. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*. 35: 449-455.
- Lloyd LS, P Winch, J Ortega-Canto, C Kendall. 1992. Results of a community-based *Aedes aegypti* control program in Merida, Yucatan, Mexico. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 46: 635-642.
- Macnamara F. 1954. Zika virus: a report on three cases of human infection during an epidemic of jaundice in Nigeria. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 48: 139-145.

- Mangudo C, JP Aparicio, RM Gleiser. 2011. Tree holes as larval habitats for *Aedes aegypti* in public areas in Aguaray, Salta province, Argentina. *Journal of vector ecology*. 36: 227-230.
- Manrique-Saide P, CR Davies, PG Coleman, E Rebollar-Tellez, A Che-Medoza, F Dzul-Manzanilla, A Zapata-Peniche. 2008. Pupal surveys for *Aedes aegypti* surveillance and potential targeted control in residential areas of Merida, Mexico. *Journal of the American Mosquito Control Association*. 24: 289-298.
- Manrique-Saide P, C Arisqueta-Chable, E Geded-Moreno, J Herrera-Bojorquez, UC Valentin, J Chable-Santos, A Che-Mendoza, EC Sánchez, JI Arredondo-Jiménez, A Medina-Barreiro. 2013. An assessment of the importance of subsurface catch basins for *Aedes aegypti* adult production during the dry season in a neighborhood of Merida, Mexico. *Journal of the American Mosquito Control Association*. 29: 164-167.
- Manrique-Saide P, V Uc, C Prado, C Carmona, J Vadillo, R Chan, S Dzib-Florez, A Che-Mendoza, M Barrera-Pérez, EC Sánchez, JI Arredondo-Jiménez. 2012. Storm sewers as larval habitats for *Aedes aegypti* and *Culex spp.* in a neighborhood of Merida, Mexico. *Journal of the American Mosquito Control Association*. 28: 255-257.
- Martínez NE, F Dzul-Manzanilla, C Gutiérrez-Castro, J Ibarra-López, W Bibiano-Marín, L López-Damián, A Martini-Jaimes, H Huerta, A Che-Mendoza, G Ayora-Talavera, P Manrique-Saide. 2014. Natural vertical transmission of dengue-1 Virus in *Aedes aegypti* populations in Acapulco, Mexico. *Journal of the American Mosquito Control Association*. 30: 143-146.
- Mazine CA, ML Macoris, MT Andrighetti, S Yasumaro, ME Silva, MJ Nelson, PJ Winch. 1996. Disposable containers as larval habitats for *Aedes aegypti* in a city with regular refuse collection: a study in Marilia, Sao Paulo State, Brazil. *Acta tropica*. 62: 1-13.
- McClelland GA, GR Conway. 1971. Frequency of blood feeding in the mosquito *Aedes aegypti*. *Nature* 232: 485-486.
- Mekuria Y, R Granados, MA Tidwell, DC Williams, RA Wirtz, DR Roberts. 1991. Malaria transmission potential by *Anopheles* mosquitoes of

- Dajabon, Dominican Republic. *Journal of the American Mosquito Control Association*. 7:456–461.
- Méndez F, M Barreto, JF Arias, G Rengifo, J Munoz, ME Burbano, B Parra. 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: 678-683.
- Mendonca HF, AL Ferreira, CB Santos, HR Rezende, GE Ferreira, GR Leite, A Falqueto. 2011. Breeding sites of *Aedes aegypti* in metropolitan vacant lots in Greater Vitoria, State of Espirito Santo, Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 44: 243-246.
- Merritt RW, RH Dadd, ED Walker. 1992. Feeding behavior, natural food, and nutritional relationships of larval mosquitoes. *Annual Review of Entomology*. 37: 349-376.
- Moore CG, BL Cline, E Ruiz-Tiben, D Lee, H Romney-Joseph, E Rivera-Correa. 1978. *Aedes aegypti* in Puerto Rico: environmental determinants of larval abundance and relation to dengue virus transmission. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 27: 1225-1231.
- Moore M, M Sylla, L Goss, MW Burugu, R Sang, LW Kamau, EU Kenya, C Bosio, L Munoz, M Sharakova, WC IV Black. 2013. Dual African origins of global *Aedes aegypti* s.l. populations revealed by mitochondrial DNA. *PLoS One*. 7: e2175.
- Morrison AC, A Costero, JD Edman, GG Clark, TW Scott. 1999. Increased fecundity of *Aedes aegypti* fed human blood before release in a mark-recapture study in Puerto Rico. *Journal of the American Mosquito Control Association*. 15: 98-104.
- Morrison AC, M Sihuincha, JD Stancil, E Zamora, H Astete, JG Olson, C Vidal-Ore, TW Scott. 2006. *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) production from non-residential sites in the Amazonian city of Iquitos, Peru. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*. 100 Suppl 1: S73-S86.
- Muñoz M, JC Navarro. 2012. Virus Mayaro: un arbovirus reemergente en Venezuela y Latinoamérica. *Biomedica. Revista del Instituto Nacional de Salud*. 32: 286-302.

- Murrell EG, SA Juliano. 2008. Detritus type alters the outcome of interspecific competition between *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae). *Journal of Medical Entomology*. 45: 375-383.
- Mustafa MS, V Rasotgi, S Jain, V Gupta. 2015. Discovery of fifth serotype of dengue virus (DENV-5): A new public health dilemma in dengue control. *Medical Journal Armed Forces India*. 71: 67-70.
- Navarrete-Espinosa J, H Gómez-Dantés. 2006. Arbovirus causales de fiebre hemorrágica en pacientes del Instituto Mexicano del Seguro Social. *Revista Médica del Instituto Mexicano del Seguro Social*. 44: 347-353.
- Nelson MJ. 1986. *Aedes aegypti*: Biology and Ecology. Washinton DC. Pan American Health Organization: 1-56.
- Normile D. 2013. Tropical Medicine. Surprising new dengue virus throws a spanner in disease control efforts. *Science*. 342: 415.
- Olano VA, MI Matiz, A Lenhart, L Cabezas, SL Vargas, JF Jaramillo, D Sarmiento, N Alexander, TA Stenstrom, HJ Overgaard. 2015. Schools as Potential Risk Sites for Vector-Borne Disease Transmission: Mosquito Vectors in Rural Schools in Two Municipalities in Colombia. *Journal of the American Mosquito Control Association*. 31: 212-222.
- PAHO. 2017. Yellow Fever. Revision. Scientific and Technical Publications. Disponible en: [http://www.paho.org/hq/index.php?option=com\\_topics&view=rdmore&cid=5514&Itemid=407](http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_topics&view=rdmore&cid=5514&Itemid=407). Consultado en Marzo de 2017.
- Pant CP, M Yasuno. 1973. Field studies on the gonotrophic cycle of *Aedes aegypti* in Bangkok, Thailand. *Journal of Medical Entomology*. 10: 219-223.
- Patiño-Beltran MR. 2001. Bionomia de *Aedes aegypti* L. Vector del dengue en el sur del estado de Jalisco, México. Tesis. Maestría en Ciencias. Monterrey, Nuevo León, México: 1-34.
- Patterson J, M Sammon, M Garg. 2016. Dengue, Zika and Chikungunya: emerging arboviruses in the new world. *Western Journal of Emergency Medicine*. 17: 671.
- Pinheiro VC, WP Tadei, PM Barros, PF Vasconcelos, AC Cruz. 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: 833-839.
- Posada D. 2008. jModelTest: phylogenetic model averaging. Molecular biology and evolution. 25: 1253-1256.
- Ramasamy R, SN Surendran, PJ Jude, S Dharshini, M Vinobaba. 2011. Larval development of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in peri-urban brackish water and its implications for transmission of arboviral diseases. PLoS One. 5: e1369.
- Regato M, R Recarey, G Moratorio, D de Mora, L García-Aguirre, M González, C Mosquera, A Alava, A Fajardo, M Álvarez, A Dubra, M Martínez, B Khan, J Cristina. 2008. Phylogenetic analysis of the NS5 gene of dengue viruses isolated in Ecuador. Virus Research. 132: 197-200.
- Reisen WK, Y Fang, VM Martinez. 2006. Vector competence of *Culiseta incidens* and *Culex thriambus* for West Nile virus. Journal of the American Mosquito Control Association. 22: 662-665.
- Rico-Hesse R. 2003. Microevolution and virulence of dengue viruses. Advances in Virus Research. 59: 315.
- Richards SL, SL Anderson, CC Lord, WJ Tabachnick. 2012. Effects of Virus Dose and Extrinsic Incubation Temperature on Vector Competence of *Culex nigripalpus* (Diptera: Culicidae) for St. Louis Encephalitis Virus. Journal of Medical Entomology. 49: 1502-1506.
- Rivera-Ávila RC. 2014. Fiebre chikungunya en México: caso confirmado y apuntes para la respuesta epidemiológica. Salud publica de Mexico. 56: 402-404.
- Robinson M. C. 1955. An epidemic of virus disease in Southern Province, Tanganyika territory, in 1952–1953. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. 49: 28-32.
- Ronquist F, M Teslenko, P van der Mark, DL Ayres, A Darling, S Hohna, B Larget, L Liu, MA Suchard, JP Huelsenbeck. 2012. MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. Systematic Biology. 61: 539-542.

- Rubio A, MV Cardo, D Vezzani. 2011. Tire-breeding mosquitoes of public health importance along an urbanisation gradient in Buenos Aires, Argentina. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 106: 678-684.
- Rueda LM, KJ Patel, RC Axtell, RE Stinner. 1990. Temperature-dependent development and survival rates of *Culex quinquefasciatus* and *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Journal of Medical Entomology*. 27: 892-898.
- Saavedra-Rodríguez K, M Beaty, S Lozano-Fuentes, S Denham, J García-Rejón, G Reyes-Solis, C Machain-Williams, MA Loroño-Pino, A Flores-Suarez, G Ponce-García, B Beaty, L Eisen, WC IV Black. 2015. Local evolution of pyrethroid resistance offsets gene flow among *Aedes aegypti* collections in Yucatan State, Mexico. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 92: 201-209.
- Salas-Luevano MA. 1993. Ciclo gonotrófico, tasa de sobrevivencia y estructura de edades de *Aedes aegypti* L. en la zona metropolitana de Monterrey, Nuevo León, México. Tesis. Maestría en Ciencias. Monterrey, Nuevo León, México: 1-47.
- Scaramozzino N, JM Crance, A Jouan, DA DeBriel, F Stoll, D Garin. 2001. Comparison of flavivirus universal primer pairs and development of a rapid, highly sensitive heminested reverse transcription-PCR assay for detection of flaviviruses targeted to a conserved region of the NS5 gene sequences. *Journal of Clinical Microbiology*. 39: 1922-1927.
- Scott TW, E Chow, D Strickman, P Kittayapong, RA Wirtz, LH Lorenz, JD Edman. 1993. Blood-feeding patterns of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) collected in a rural Thai village. *Journal of Medical Entomology*. 30: 922-927.
- Scott TW, AC Morrison, LH Lorenz, GG Clark, D Strickman, P Kittayapong, H Zhou, JD Edman. 2000. Longitudinal studies of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) in Thailand and Puerto Rico: population dynamics. *Journal of Medical Entomology*. 37: 77-88.
- Scherer WF, RW Dickerman, A Diaz-Najera, BA Ward, MH Miller, PA Schaffer. 1971. Ecologic studies of Venezuelan encephalitis virus in southeastern Mexico. 3. Infection of mosquitoes. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 20: 969-979.

- Schultz GW. 1989. Cemetery vase breeding of dengue vectors in Manila, Republic of the Philippines. *Journal of the American Mosquito Control Association*. 5: 508-513.
- Sheppard P, W Macdonald, R Tonn, B Grab. 1969. The dynamics of an adult population of *Aedes aegypti* in relation to dengue haemorrhagic fever in Bangkok. *The Journal of Animal Ecology*. 661-702.
- Simonin Y, D van Riel, P Van de Perre, B Rockx, S Salinas. 2017. Differential virulence between Asian and African lineages of Zika virus. *PLoS One*. 11: e0005821.
- SSM. 2017. Guía metodológica de estudios entomológicos para fase larvaria y pupal. Secretaria de Salud de México (Disponible en: [http://www.cenaprece.salud.gob.mx/programas/interior/vectores/descargas/pdf/guia\\_entomologica\\_fase\\_larvaria\\_pupal.pdf](http://www.cenaprece.salud.gob.mx/programas/interior/vectores/descargas/pdf/guia_entomologica_fase_larvaria_pupal.pdf)). Consultado en diciembre de 2017.
- Teixeira MG, AM Andrade, NC Maria da Conceição, JS Castro, FL Oliveira, CS Goes, M Maia, EB Santana, BT Nunes, PF Vasconcelos. 2015. East/Central/South african genotype chikungunya virus, Brazil, 2014. *Emerging Infectious Diseases*. 21: 906.
- Thongsripong P, A Green, P Kittayapong, D Kapan, B Wilcox, S Bennett. 2013. Mosquito vector diversity across habitats in central Thailand endemic for dengue and other arthropod-borne diseases. *PLoS One*. 7: e2507.
- Tovar-Zamora I, A Ramos-Rodríguez, JFM Galván, R Servín-Villegas. 2015. Entomological Indicators to Assess Larval *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) Control in Baja California Sur, México. *Southwestern Entomologist*. 40: 81-96.
- Troyo A, O Calderon-Arguedas, DO Fuller, ME Solano, A Avendano, KL Arheart, DD Chadee, JC Beier. 2008. Seasonal profiles of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) larval habitats in an urban area of Costa Rica with a history of mosquito control. *Journal of Vector Ecology*. 33: 76-88.
- Trpis M, W Hausermann. 1986. Dispersal and other population parameters of *Aedes aegypti* in an African village and their possible significance in epidemiology of vector-borne diseases. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 35: 1263-1279.

- Tsuzuki A, TD Vu, Y Higa, TY Nguyen, M Takagi. 2009. Effect of peridomestic environments on repeated infestation by preadult *Aedes aegypti* in urban premises in Nha Trang City, Vietnam. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 81: 645-650.
- Ulloa A, HH Ferguson, JD Mendez-Sanchez, R Danis-Lozano, M Casas-Martinez, JG Bond, JC Garcia-Zebadua, A Orozco-Bonilla, JA Juarez-Ordaz, JA Farfán-Ale, JE García-Rejón, EP Rosado-Paredes, E Edwards, N Komar, HK Hassan, TR Unnasch, MA Rodriguez-Perez. 2009. West Nile virus activity in mosquitoes and domestic animals in Chiapas, Mexico. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*. 9: 555-560.
- Undurraga EA, M Betancourt-Cravioto, J Ramos-Castaneda, R Martinez-Vega, J Mendez-Galvan, DJ Gubler, MG Guzman, SB Halstead, E Harris, P Kuri-Morales, R Tapia-Conyer, DS Shepard. 2015. Economic and disease burden of dengue in Mexico. *PLoS One*. 9: e0003547.
- Urdaneta L, F Herrera, M Pernalete, N Zoghbi, Y Rubio-Palis, R Barrios, J Rivero, G Comach, M Jiménez, M Salcedo. 2005. Detection of dengue viruses in field-caught *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) in Maracay, Aragua state, Venezuela by type-specific polymerase chain reaction. *Infection Genetics Evolution*. 5: 177-184.
- Vera-Maloof FZ, K Saavedra-Rodríguez, AE Elizondo-Quiroga, S Lozano-Fuentes, WC IV Black. 2015. Coevolution of the Ile1,016 and Cys1,534 Mutations in the Voltage Gated Sodium Channel Gene of *Aedes aegypti* in Mexico. *PLoS One*. 9: e0004263.
- Vezzani D, N Schweigmann. 2002. Suitability of containers from different sources as breeding sites of *Aedes aegypti* (L.) in a cemetery of Buenos Aires City, Argentina. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 97: 789-792.
- Vezzani D, AP Albicocco. 2009. The effect of shade on the container index and pupal productivity of the mosquitoes *Aedes aegypti* and *Culex pipiens* breeding in artificial containers. *Medical and Veterinary Entomology*. 23: 78-84.
- Vezzani D, SM Velázquez, S Soto, NJ Schweigmann. 2001. Environmental characteristics of the cemeteries of Buenos Aires City (Argentina) and infestation

- levels of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). Memorias do Instituto Oswaldo Cruz. 96: 467-471.
- Villegas-Trejo A, A Che-Mendoza, M González-Fernández, G Guillermo-May, H González-Bejarano, F Dzul-Manzanilla, A Ulloa-García, R Danis-Lozano, P Manrique-Saide. 2011. Targeted treatment of *Aedes aegypti* at localities with high risk for dengue transmission, Morelos, Mexico. Salud Pública de México. 53: 141-151.
- Wai KT, N Arunachalam, S Tana, F Espino, P Kittayapong, W Abeyewickreme, D Hapangama, BK Tyagi, PT Htun, S Koyadun, A Kroeger, J Sommerfeld, M Petzold. 2012. Estimating dengue vector abundance in the wet and dry season: implications for targeted vector control in urban and peri-urban Asia. Pathogens and Global Health. 106: 436-445.
- Wang L, SG Valderramos, A Wu, S Ouyang, C Li, P Brasil, M Bonaldo, T Coates, K Nielsen-Saines, T Jiang. 2016. From mosquitos to humans: genetic evolution of Zika virus. Cell Host & Microbe. 19: 561-565.
- Watts DM, DS Burke, BA Harrison, RE Whitmire, A Nisalak. 1987. Effect of temperature on the vector efficiency of *Aedes aegypti* for dengue 2 virus. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. 36: 143-152.
- Weaver SC, AD Barrett. 2004. Transmission cycles, host range, evolution and emergence of arboviral disease. Nature Reviews. Microbiology. 2: 789-801.
- Weaver SC, NL Forrester. 2015. Chikungunya: Evolutionary history and recent epidemic spread. Antiviral Research. 120: 32-39.
- WHO. 1975. Manual on practical entomology in malaria. Part II. Methods and techniques. World Health Organization Geneva, Switzerland.
- WHO. 2009. Dengue: Guidelines for Diagnosis, Treatment, Prevention and Control. World Health Organization, Geneva 1-60.
- Winch PJ, G Barrientos-Sánchez, E Puigserver-Castro, L Manzano-Cabrera, LS Lloyd, JF Méndez-Galván. 1992. Variation in *Aedes aegypti* larval indices over a one year period in a neighborhood of Merida, Yucatan, Mexico. Journal of the American Mosquito Control Association. 8: 193-195.

- Wong J, H Astete, AC Morrison, TW Scott. 2011. Sampling considerations for designing *Aedes aegypti* (Diptera:Culicidae) oviposition studies in Iquitos, Peru: substrate preference, diurnal periodicity, and gonotrophic cycle length. *Journal of Medical Entomology*. 48: 45-52.
- Zanluca C, VC de Melo, ALP Mosimann, GIV de Santos, CND d Santos, K Luz. 2015. First report of autochthonous transmission of Zika virus in Brazil. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 110: 569-572.
- Zarate-Nahon EA, R Ramírez-Jiménez, MS Alvarado-Moreno, RM Sánchez-Casas, M Laguna-Aguilar, OS Sánchez-Rodríguez, AM Rivas-Estilla, J Ramos-Jiménez, CEM de la Garza, J Villareal-Pérez. 2013. *Aedes aegypti* mosquitoes at nonresidential sites might be related to transmission of dengue virus in Monterrey, Northeastern Mexico. *Southwestern Entomologist*. 38: 465-476.

## 10. ANEXOS

Anexo 1. Número de acceso del virus del dengue en el GenBank.

Numero de acceso	Clave de la variante	Serotipo	Año de colección	Estado	Pais
KU232287	Variant1	1	2015	Pernambuco	Brazil
KU232286	Variant1	1	2015		Brazil
En el estudio	Variant2	1	2016	Yucatan	Mexico
KF973475	Variant3	1	2012		Nicaragua
KF973472	Variant3	1	2012		Nicaragua
KF973467	Variant3	1	2012		Nicaragua
KF973466	Variant3	1	2012		Nicaragua
KF973463	Variant3	1	2012		Nicaragua
KF973460	Variant3	1	2012		Nicaragua
KF973458	Variant3	1	2012		Nicaragua
KF973456	Variant3	1	2012		Nicaragua
KF973455	Variant3	1	2012		Nicaragua
KF973454	Variant3	1	2012		Nicaragua
KJ189349	Variant3	1	2011	Yucatan	Mexico
KJ189348	Variant3	1	2011	Yucatan	Mexico
GQ199859	Variant3	1	2008	Managua	Nicaragua
KJ189342	Variant4	1	2009	Yucatan	Mexico
KJ189341	Variant4	1	2009	Yucatan	Mexico
KF973474	Variant5	1	2012		Nicaragua
KF973473	Variant6	1	2012		Nicaragua
KJ189359	Variant7	1	2012		Puerto Rico
KJ189345	Variant8	1	2009	Yucatan	Mexico
KJ189343	Variant8	1	2009	Yucatan	Mexico
KJ189339	Variant8	1	2008	Yucatan	Mexico
KJ189337	Variant8	1	2008	Yucatan	Mexico
KJ189333	Variant8	1	2008	Yucatan	Mexico
KJ189332	Variant8	1	2008	Yucatan	Mexico
KJ189331	Variant8	1	2008	Yucatan	Mexico
KJ189321	Variant8	1	2007	Yucatan	Mexico
KJ189320	Variant8	1	2007	Yucatan	Mexico
KJ189319	Variant8	1	2007	Yucatan	Mexico
KJ189318	Variant8	1	2007	Yucatan	Mexico

KJ189313	Variant8	1	2008	Yucatan	Mexico
KF955443	Variant8	1	2007	Yucatan	Mexico
KF955442	Variant8	1	2007	Yucatan	Mexico
KF955433	Variant8	1	2008	Yucatan	Mexico
KF955422	Variant8	1	2007	Yucatan	Mexico
JQ675358	Variant8	1	2010	Florida	USA
JQ287666	Variant8	1	2009	Managua	Nicaragua
JN819403	Variant8	1	2006	Managua	Nicaragua
JN819402	Variant8	1	2005	Managua	Nicaragua
JF937644	Variant8	1	2009	Managua	Nicaragua
JF937645	Variant8	1	2009	Managua	Nicaragua
HM631855	Variant8	1	2007	Yucatan	Mexico
GU131976	Variant8	1	2007	Yucatan	Mexico
GU131968	Variant8	1	2007	Yucatan	Mexico
GU131966	Variant8	1	2007	Yucatan	Mexico
GU131964	Variant8	1	2007	Yucatan	Mexico
GU131961	Variant8	1	2007	Yucatan	Mexico
GU131960	Variant8	1	2007	Yucatan	Mexico
GU131958	Variant8	1	2006	Yucatan	Mexico
GQ868539	Variant8	1	2008	Yucatan	Mexico
GQ868536	Variant8	1	2008	Yucatan	Mexico
GQ868527	Variant8	1	2007	Yucatan	Mexico
GQ868509	Variant8	1	2007	Yucatan	Mexico
GQ868503	Variant8	1	2007	Yucatan	Mexico
GQ868501	Variant8	1	2007	Yucatan	Mexico
GQ868499	Variant8	1	2006	Quintana Roo	Mexico
GQ868498	Variant8	1	2006	Yucatan	Mexico
GQ199875	Variant8	1	2004	Managua	Nicaragua
GQ199873	Variant8	1	2004	Managua	Nicaragua
GQ199872	Variant8	1	2004	Managua	Nicaragua
GQ199867	Variant8	1	2004	Managua	Nicaragua
FJ898433	Variant8	1	2007	Managua	Nicaragua
FJ873814	Variant8	1	2005	Managua	Nicaragua
FJ850114	Variant8	1	2005	Managua	Nicaragua
FJ850113	Variant8	1	2005	Managua	Nicaragua
KF955408	Variant9	1	2007		Venezuela
KF955407	Variant9	1	2005		Venezuela

JN819415	Variant9	1	2006	Aragua	Venezuela
JN819413	Variant9	1	2006	Aragua	Venezuela
JN819412	Variant9	1	2006	Aragua	Venezuela
JN819411	Variant9	1	2005	Aragua	Venezuela
JN819405	Variant9	1	2006	Merida	Venezuela
GU131842	Variant9	1	2007	Aragua	Venezuela
GQ868570	Variant9	1	2008	Santander	Colombia
GQ868562	Variant9	1	2005	Santander	Colombia
FJ882579	Variant9	1	2007	Aragua	Venezuela
FJ873809	Variant9	1	2007	Aragua	Venezuela
FJ850101	Variant9	1	2007	Aragua	Venezuela
FJ850100	Variant9	1	2007	Aragua	Venezuela
FJ850099	Variant9	1	2007	Aragua	Venezuela
FJ850093	Variant9	1	2008		Brazil
FJ639824	Variant9	1	2006	Aragua	Venezuela
FJ639823	Variant9	1	2006	Aragua	Venezuela
FJ639820	Variant9	1	2006	Aragua	Venezuela
FJ639818	Variant9	1	2006	Aragua	Venezuela
FJ639813	Variant9	1	2005	Aragua	Venezuela
FJ639812	Variant9	1	2005	Aragua	Venezuela
FJ639802	Variant9	1	2005	Aragua	Venezuela
FJ639796	Variant9	1	2005	Aragua	Venezuela
GU056032	Variant10	1	1998	Aragua	Venezuela
FJ898437	Variant10	1	2004	Managua	Nicaragua
KJ189370	Variant1	2	2011		Mexico
En el estudio	Variant2	2	2016	Yucatan	Mexico
KJ189311	Variant3	2	2007	Yucatan	Mexico
KF955395	Variant3	2	2007	Yucatan	Mexico
GU131975	Variant3	2	2007	Yucatan	Mexico
GU131974	Variant3	2	2007	Yucatan	Mexico
GU131955	Variant3	2	2004	Quintana Roo	Mexico
GQ868516	Variant3	2	2007	Yucatan	Mexico
GQ868515	Variant3	2	2007	Yucatan	Mexico
FJ898438	Variant3	2	2002	Nayarit	Mexico
HQ999999	Variant5	2	2009	Guatemala	Guatemala
GQ868598	Variant6	2	1991		Venezuela
GQ868595	Variant6	2	1991		Venezuela

GQ868596	Variant6	2	1991		Venezuela
KF955385	Variant4	2	2007		Venezuela
KF955369	Variant4	2	2007		Nicaragua
KF955368	Variant4	2	2007		Nicaragua
KF955366	Variant4	2	2007		Nicaragua
KF955365	Variant4	2	2013		Venezuela
KF955340	Variant4	2	2013		Venezuela
JX079691	Variant4	2	2007	Managua	Nicaragua
JX079690	Variant4	2	2007	Managua	Nicaragua
JX079688	Variant4	2	2008	Sandino	Nicaragua
HQ332190	Variant4	2	2007		Venezuela
HQ332189	Variant4	2	2007		Venezuela
HQ332188	Variant4	2	2007		Venezuela
HQ332185	Variant4	2	2007		Venezuela
HQ332184	Variant4	2	2006		Venezuela
JN819424	Variant4	2	2006	Carazo	Nicaragua
JN819421	Variant4	2	2007	Managua	Nicaragua
JN819420	Variant4	2	2007	Managua	Nicaragua
JN819407	Variant4	2	2007	Merida	Venezuela
JF730052	Variant4	2	2009	Managua	Nicaragua
JF730051	Variant4	2	2009	Managua	Nicaragua
JF357907	Variant4	2	2007	Managua	Nicaragua
JF357905	Variant4	2	2007	Managua	Nicaragua
HQ733861	Variant4	2	2006	Managua	Nicaragua
HQ705625	Variant4	2	2009	Managua	Nicaragua
HQ634199	Variant4	2	2007	Managua	Nicaragua
HQ541792	Variant4	2	2008	Managua	Nicaragua
HQ541787	Variant4	2	2008	Managua	Nicaragua
HQ541786	Variant4	2	2006	Managua	Nicaragua
EU482690	Variant4	2	2006	Managua	Nicaragua
GQ868556	Variant4	2	2005	Santander	Colombia
GQ868554	Variant4	2	2004	Santander	Colombia
GQ868641	Variant4	2	2007	Aragua	Venezuela
GQ868604	Variant4	2	2005	Managua	Nicaragua
GQ199869	Variant4	2	2007	Managua	Nicaragua
GQ199868	Variant4	2	2007	Managua	Nicaragua
GQ199866	Variant4	2	2007	Managua	Nicaragua
FJ882594	Variant4	2	2007	Managua	Nicaragua

FJ882593	Variant4	2	2007	Managua	Nicaragua
FJ898479	Variant4	2	2007	Managua	Nicaragua
FJ898478	Variant4	2	2000	Leon	Nicaragua
FJ906960	Variant4	2	2007	Managua	Nicaragua
FJ898467	Variant4	2	2005	Aragua	Venezuela
FJ898434	Variant4	2	2007	Managua	Nicaragua
FJ898432	Variant4	2	2007	Managua	Nicaragua
FJ850112	Variant4	2	2004	Caracas	Venezuela
FJ850107	Variant4	2	2008	Aragua	Venezuela
FJ850106	Variant4	2	2008	Aragua	Venezuela
FJ850105	Variant4	2	2007	Aragua	Venezuela
FJ850051	Variant4	2	2007	Managua	Nicaragua
FJ850050	Variant4	2	2007	Managua	Nicaragua
FJ850116	Variant4	2	2007	Managua	Nicaragua
FJ810418	Variant4	2	2008	Managua	Nicaragua
FJ744708	Variant4	2	2007	Managua	Nicaragua
FJ744707	Variant4	2	2007	Managua	Nicaragua
FJ744706	Variant4	2	2007	Managua	Nicaragua
FJ744743	Variant4	2	2007	Managua	Nicaragua
FJ744742	Variant4	2	2006	Carazo	Nicaragua
FJ744703	Variant4	2	2007	Managua	Nicaragua
FJ639836	Variant4	2	2007	Managua	Nicaragua
FJ639835	Variant4	2	2007	Managua	Nicaragua
FJ639834	Variant4	2	2007	Managua	Nicaragua
FJ639833	Variant4	2	2007	Managua	Nicaragua
FJ639809	Variant4	2	2005	Aragua	Venezuela
FJ639733	Variant4	2	2005	Aragua	Venezuela
FJ639732	Variant4	2	2005	Aragua	Venezuela
FJ547090	Variant4	2	2007	Managua	Nicaragua
FJ478459	Variant4	2	2007	Managua	Nicaragua
FJ478455	Variant4	2	2005	Managua	Nicaragua
FJ390391	Variant4	2	2007	Managua	Nicaragua
FJ373301	Variant4	2	2007	Managua	Nicaragua
FJ373300	Variant4	2	2007	Managua	Nicaragua
FJ205885	Variant4	2	2008	Managua	Nicaragua
FJ182014	Variant4	2	2007	Managua	Nicaragua
EU660406	Variant4	2	2007	Managua	Nicaragua
EU660405	Variant4	2	2007	Managua	Nicaragua

EU660404	Variant4	2	2007	Managua	Nicaragua
EU621672	Variant4	2	2007	Managua	Nicaragua
EU596500	Variant4	2	2007	Managua	Nicaragua
EU596499	Variant4	2	2007	Managua	Nicaragua
EU596498	Variant4	2	2007	Managua	Nicaragua
EU596497	Variant4	2	2007	Managua	Nicaragua
EU596496	Variant4	2	2007	Managua	Nicaragua
EU596495	Variant4	2	2007	Managua	Nicaragua
EU596483	Variant4	2	2006	Managua	Nicaragua
EU569702	Variant4	2	2007	Managua	Nicaragua
EU569701	Variant4	2	2007	Managua	Nicaragua

Anexo 2. Número de acceso del virus del Zika en el GenBank.

Secuencia en GenBank	Clave de la variante	Año de colecta	Estado	País
En el estudio	V1	2016	Yucatan	Mexico
MF801426	V2	2016		Nicaragua
MF801424	V2	2016	Yucatan	Mexico
MF801423	V2	2016	Guerrero	Mexico
MF801422	V2	2016	Guerrero	Mexico
MF801420	V2	2016	Chiapas	Mexico
MF801418	V2	2016	Chiapas	Mexico
MF801417	V2	2016	Chiapas	Mexico
MF801414	V2	2016	Guerrero	Mexico
MF801413	V2	2016	Guerrero	Mexico
MF801412	V2	2016	Guerrero	Mexico
MF801411	V2	2016	Guerrero	Mexico
MF801410	V2	2016	Guerrero	Mexico
MF801408	V2	2016	Chiapas	Mexico
MF801406	V2	2016	Oaxaca	Mexico
MF801405	V2	2016	Guerrero	Mexico
MF801403	V2	2016	Chiapas	Mexico
MF801402	V2	2016	Chiapas	Mexico
MF801401	V2	2016	Chiapas	Mexico
MF801400	V2	2016	Chiapas	Mexico
MF801399	V2	2016	Chiapas	Mexico
MF801398	V2	2016	Chiapas	Mexico
MF801396	V2	2016	Chiapas	Mexico
MF801395	V2	2016	Chiapas	Mexico
MF801391	V2	2016	Oaxaca	Mexico
MF801389	V2	2016	Roatan	Honduras
MF801387	V2	2016	Roatan	Honduras
MF801386	V2	2016	Roatan	Honduras
MF801385	V2	2016	Roatan	Honduras
MF801384	V2	2016	Roatan	Honduras
MF801383	V2	2016		Honduras
MF801377	V3	2016		El Salvador
KX906952	V2	2016		Honduras
MF593625	V2	2016		China
MF434522	V2	2016	Managua	Nicaragua
MF434521	V2	2016	Managua	Nicaragua
MF434517	V2	2016	Managua	Nicaragua

MF434516	V2	2016	Managua	Nicaragua
MF159531	V2	2017	Miami	USA
MF098771	V2	2017		Russia
MF098770	V2	2016		Russia
KY927808	V2	2016	Henan	China
KY765327	V2	2016	Managua	Nicaragua
KY765326	V2	2016	Managua	Nicaragua
KY765325	V2	2016	Managua	Nicaragua
KY765324	V2	2016	Managua	Nicaragua
KY765323	V2	2016	Managua	Nicaragua
KY765320	V2	2016	Managua	Nicaragua
KY785461	V2	2016	Francisco Morazan	Honduras
KY785457	V2	2016	Florida	USA
KY785452	V2	2016	Francisco Morazan	Honduras
KY785442	V2	2016	Francisco Morazan	Honduras
KY785431	V2	2016	Francisco Morazan	Honduras
KY785418	V2	2016	Francisco Morazan	Honduras
KY785414	V2	2016	Francisco Morazan	Honduras
KY693677	V2	2016		Honduras
KY693676	V2	2016		Honduras
KY631494	V2	2015	Tapachula, Chiapas	Mexico
KY631493	V2	2015	Tapachula, Chiapas	Mexico
KY648934	V2	2016	Chiapas	Mexico
KY014327	V2	2016	Francisco Morazan	Honduras
KY014319	V2	2016	Francisco Morazan	Honduras
KY014315	V2	2016	Francisco Morazan	Honduras
KY014312	V2	2016	Francisco Morazan	Honduras
KY014310	V2	2016	Francisco Morazan	Honduras
KY014306	V2	2016	Francisco Morazan	Honduras
KY606274	V2	2016	Guerrero	Mexico
KY606273	V2	2016	Guerrero	Mexico
KY606272	V2	2016	Oaxaca	Mexico
KY606271	V2	2016	Chiapas	Mexico
KX421195	V2	2016		Nicaragua
KX421194	V2	2016		Nicaragua
KY325479	V2	2016	Florida	USA
KY325465	V2	2016	Florida	USA
KY328289	V2	2016		Honduras
KX694534	V2	2016		Honduras
KX856011	V2	2016	Chiapas	Mexico

KX262887	V2	2016		Honduras
KU870645	V2	2016		USA
KU501217	V2	2015		Guatemala
KU501216	V2	2015		Guatemala
MF099651	V3	2016	Guizhou	China
MF801421	V3	2016	Chiapas	Mexico
MF801419	V4	2016	Chiapas	Mexico
MF801397	V5	2016	Campeche	Mexico
MF801381	V6	2016		Honduras
MF794971	V3	2016		Ecuador
MF692778	V3	2016		Taiwan
MF574588	V3	2016	Barranquilla	Colombia
MF574587	V3	2016	Barranquilla	Colombia
MF574586	V3	2016	Barranquilla	Colombia
MF574585	V3	2016	Barranquilla	Colombia
MF574584	V3	2016	Barranquilla	Colombia
MF574583	V3	2016	Barranquilla	Colombia
MF574582	V3	2016	Barranquilla	Colombia
MF574581	V3	2016	Barranquilla	Colombia
MF574580	V3	2016	Barranquilla	Colombia
MF574577	V3	2016	Barranquilla	Colombia
MF574576	V3	2016	Barranquilla	Colombia
MF574575	V3	2015	Barranquilla	Colombia
MF574574	V3	2015	Barranquilla	Colombia

Anexo 3. Distancia genética (el modelo de dos parámetros de Kimura) entre las diferentes variantes de DENV-1 (debajo de la diagonal) y el error estándar entre las variantes (arriba de la diagonal).

	V1	V2	V3	V4	V5	V6	V7	V8	V9	V10
V1		0.009	0.012	0.010	0.013	0.013	0.008	0.011	0.011	0.011
V2	0.015		0.011	0.011	0.012	0.012	0.012	0.012	0.012	0.012
V3	0.030	0.025		0.007	0.005	0.005	0.009	0.007	0.005	0.005
V4	0.020	0.025	0.010		0.008	0.008	0.008	0.005	0.009	0.005
V5	0.035	0.030	0.005	0.015		0.007	0.010	0.008	0.007	0.007
V6	0.035	0.030	0.005	0.015	0.010		0.010	0.008	0.007	0.007
V7	0.015	0.030	0.015	0.015	0.020	0.020		0.008	0.007	0.007
V8	0.025	0.030	0.010	0.005	0.015	0.015	0.015		0.009	0.005
V9	0.025	0.030	0.005	0.015	0.010	0.010	0.010	0.015		0.007
V10	0.025	0.030	0.005	0.005	0.010	0.010	0.010	0.005	0.010	

V1: DENV-1, Brasil-2015

V2: DENV-1, Mex-2016 (del presente estudio)

Anexo 4. Distancia genética (el modelo de dos parámetros de Kimura) entre las diferentes variantes de DENV-2 (debajo de la diagonal) y el error estándar entre las variantes (arriba de la diagonal).

	V1	V2	V3	V4	V5	V6
V1		0.010	0.007	0.007	0.007	0.010
V2	0.020		0.012	0.012	0.012	0.012
V3	0.010	0.030		0.007	0.010	0.010
V4	0.010	0.030	0.010		0.007	0.007
V5	0.010	0.030	0.020	0.010		0.007
V6	0.020	0.030	0.020	0.010	0.010	

V1: DENV-2, Mexico-2011

V2: DENV-2, Mex-2016 (del presente estudio)

Anexo 5. Alineamiento de las variantes genéticas del virus del Zika (NS5 (172 nt) y secuencias de los aminoácidos.

Muestra	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>10</b>	<b>11</b>	<b>12</b>	<b>13</b>	<b>14</b>	<b>15</b>	<b>16</b>	<b>17</b>	<b>18</b>	<b>19</b>	<b>20</b>
V1 (N=1)	L	E	F	E	A	L	G	F	L	N	E	D	H	W	M	G	R	E	N	S
V2 (N=80)	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
V3 (N=17)	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
V4 (N=1)	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
V5 (N=1)	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
V6 (N=1)	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
	<b>21</b>	<b>22</b>	<b>23</b>	<b>24</b>	<b>25</b>	<b>26</b>	<b>27</b>	<b>28</b>	<b>29</b>	<b>30</b>	<b>31</b>	<b>32</b>	<b>33</b>	<b>34</b>	<b>35</b>	<b>36</b>	<b>37</b>	<b>38</b>	<b>39</b>	<b>40</b>
V1	G	G	G	V	E	G	L	G	L	Q	R	L	G	Y	V	L	E	E	M	S
V2	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
V3	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
V4	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
V5	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
V6	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	I	.	.	.	.	.
	<b>41</b>	<b>42</b>	<b>43</b>	<b>44</b>	<b>45</b>	<b>46</b>	<b>47</b>	<b>48</b>	<b>49</b>	<b>50</b>	<b>51</b>	<b>52</b>	<b>53</b>	<b>54</b>	<b>55</b>	<b>56</b>				
V1	C	I	P	G	G	R	M	Y	A	D	D	T	A	G	W	D				
V2	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.				
V3	R	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.				
V4	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.				
V5	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.				
V6	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.				

Anexo 6. Distancia genética (el modelo de dos parámetros de Kimura) entre las diferentes variantes del VZIK (debajo de la diagonal) y el error estándar entre las variantes (arriba de la diagonal).

Muestra	V1	V2	V3	V4	V5	V6
V1			0.01	0.012	0.012	0.011
V2	0.018		0.006	0.006	0.006	0.006
V3	0.024	0.006		0.008	0.008	0.008
V4	0.024	0.006	0.012		0.008	0.008
V5	0.024	0.006	0.012	0.012		0.008
V6	0.024	0.006	0.012	0.012	0.012	