

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



**TESIS**

**DETECCIÓN DE *Aedes Aegypti* INFECTADO CON EL VIRUS DENGUE  
COMO UN MÉTODO COMPLEMENTARIO PARA AUMENTAR LA  
SENSIBILIDAD DE LA VIGILANCIA: IDENTIFICACIÓN DE LOS SEROTIPOS  
1, 2 Y 4 POR RT-PCR EN QUINTANA ROO, MÉXICO**

**POR**

**MTRO. JORGE FERNANDO MÉNDEZ GALVÁN**

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

**OCTUBRE, 2014**

**DETECCIÓN DE *Aedes aegypti* INFECTADO CON EL VIRUS DENGUE COMO UN MÉTODO COMPLEMENTARIO PARA AUMENTAR LA SENSIBILIDAD DE LA VIGILANCIA: IDENTIFICACIÓN DE LOS SEROTIPOS 1, 2 Y 4 POR RT-PCR EN QUINTANA ROO, MÉXICO**

**Comité de Tesis**

---

**Ildefonso Fernández Salas, Ph. D.**  
**Director de tesis**

---

**Eduardo Alfonso Rebollar Téllez, Ph. D.**  
**Secretario**

---

**Dr. Roberto Mercado Hernández**  
**Vocal**

---

**Dr. Raúl Torres Zapata**  
**Vocal**

---

**Dr. Feliciano Segovia Salinas**  
**Vocal**

## **RESUMEN BIOGRÁFICO**

**Jorge Fernando Méndez Galván**

Candidato para el Grado de

Doctor en Ciencias con Acentuación en Entomología Médica

**DETECCIÓN DE *Aedes aegypti* INFECTADO CON EL VIRUS DENGUE COMO UN MÉTODO COMPLEMENTARIO PARA AUMENTAR LA SENSIBILIDAD DE LA VIGILANCIA: IDENTIFICACIÓN DE LOS SEROTIPOS 1, 2 Y 4 POR RT-PCR EN QUINTANA ROO, MÉXICO**

**Campo de Estudio:** Biología de los principales vectores en México

**Datos Personales:** Lugar y fecha de Nacimiento. México Distrito Federal, 18 de marzo de 1951.

**Educación:**

Médico Cirujano, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de México 1971-1976

Maestro en Salud Pública, Escuela de Salud Pública de México, SSA 1978

Master in Health Sciences, The Johns Hopkins University, 1988-1990

## **Experiencia Profesional:**

Director Fundador del Centro de Investigaciones de Paludismo (ahora Centro Regional de Investigaciones en Salud Pública-INSP/SSA). 1980-1986.

Director de Servicios de Salud, Secretaría de Salud del estado de Chiapas 1993

Jefe del Departamento de Vigilancia Epidemiológica de Enfermedades Transmitidas por Vectores, Dirección General de Epidemiología, SSA. 1994

Director del Programa Nacional de Prevención y Control de Enfermedades Transmitidas por Vectores, SSA. 1997-2006.

Médico Especialista e Investigador en el Hospital Infantil de México Federico Gómez, SSA. 2007 a la fecha.

Miembro del Sistema Nacional de Investigadores CONACyT, Nivel 1. 2007 a la fecha.

Inscrito en el Curso de Doctorado en Ciencias con Enfoque en Entomología Médica, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León. 2009-

## AGRADECIMIENTOS

A la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León, por la oportunidad que me ha brindado para concluir mi Doctorado.

Al Dr. José Alberto García Aranda, Director General del Hospital Infantil de México Federico Gómez, por su apoyo y comprensión durante el tiempo que he dedicado a mi doctorado.

Al Dr. Onofre Muñoz Hernández y al Dr. Juan Garduño Espinosa quienes me han permitido continuar preparándome en mi quehacer profesional.

A Jesús Kumate Rodríguez (+) quien ha sido inspiración en mi vida y por haber recibido un gran apoyo suyo. A Roberto Tapia Conyer por su confianza que depositó en mi trabajo.

Al proyecto “Análisis filogenético de poblaciones del virus Dengue (DENV) aislados del mosquito vector *Ae. aegypti* en tres localidades geográficamente separadas de México: Monterrey, Chetumal y Acapulco” *FONSALUD-CONACYT 2010 141768*.

## **DEDICATORIA**

Al Dr. Ildefonso Fernández, por su gran apoyo y amistad que durante muchos años hemos compartido en el quehacer de la Entomología Médica y en la preocupación por la Salud Pública de los mexicanos.

A la Dra. Rosa María Sánchez por su invaluable dedicación y apoyo que me ha brindado en este trayecto de vida profesional.

En memoria de la Comisión Nacional de Erradicación del Paludismo y sus trabajadores (1958-1982), en especial a Carlos Trimmer (+), Jaime Grajales, Ruperto Quintero (+), Francisco Rodríguez, Gildardo Zenteno, por mencionar algunos. A mis compañeros de los Programas Nacional y Estatales de Prevención y Control de Enfermedades Transmitidas por Vectores, quienes juntos alcanzamos logros muy importantes para la sociedad mexicana.

Al Dr. Antonio García Sánchez, Manuel Albores Zavaleta (+) y Rosa María Acevedo Mascarúa (+)

A José Ignacio Santos Preciado.

A las familias Méndez Galván y Pérez Torres con quienes crecí y aprendí la necesidad de seguir superándome.

En especial, a mi esposa Meluz quien me ha acompañado siempre aún sacrificando su vida personal, apoyando mis decisiones; a mis hijos Alejandra, Gabriela, Verónica y Jorge, así como a mis nietos Rodrigo, Regina, Mila y Layla, quienes han sido mi inspiración y me han acompañado siempre en todos los trabajos que he realizado. Todos ellos han aprendido y trabajado conmigo en que son los mosquitos, que transmiten y como se deben controlar para evitar sus daños.

## TABLA DE CONTENIDO

Sección	Página
AGRADECIMIENTOS.....	
LISTA DE TABLAS.....	10
LISTA DE FIGURAS.....	11
LISTA DE GRAFICAS.....	12
LISTA DE MAPAS.....	13
NOMENCLATURA.....	14
RESUMEN.....	15
ABSTRACT.....	16
1. INTRODUCCION.....	17
2. HIPÓTESIS.....	19
3. OBJETIVOS.....	20
3.1 Objetivo general	
3.2 Objetivos particulares	
4. ANTECEDENTES.....	21
4.1 Aspectos generales .....	21
4.2 Agente etiológico.....	22
4.2.1. Estructura del virión.....	23
4.2.2. Replicación y ensamblaje de las partículas virales....	27
4.3 Distribución de serotipos.....	31
4.3.1. Variación de virus dengue entre serotipos.....	33
4.4 Casos de Dengue en México.....	40
4.5 <i>Ae. aegypti</i> como vector.....	41
4.5.1. Oviposición y hábitats larvarios.....	41
4.5.2. Comportamiento adulto.....	42
4.5.3. Capacidad del vector.....	44

4.5.4. Capacidad vectorial.....	44
4.5.5. Importancia de la detección de serotipos circulantes....	45
4.6 Distribución geográfica.....	45
4.7 Ciclo biológico.....	46
4.7.1. Huevos.....	47
4.7.2. Larva.....	48
4.7.3. Pupa.....	48
4.7.4. Adultos.....	48
4.7.5. Ciclo gonotrófico.....	49
4.8 Enfermedad.....	49
4.8.1. Fiebre por Dengue (FD).....	51
4.8.2. Fiebre hemorrágica por Dengue (FHD).....	51
4.8.3. Síndrome de Shock por Dengue (SSD).....	52
4.9 Epidemiología.....	53
4.9.1. Distribución geográfica.....	53
4.9.2. Nivel Mundial.....	53
4.9.3. México.....	55
4.9.4. Seroepidemiología en México.....	57
4.9.5. Transmisión.....	58
4.9.6. Período extrínseco de incubación.....	59
4.9.7. Período intrínseco de incubación.....	60
4.9.8. Factores involucradas en las epidemias de Dengue.....	60
4.9.8.1. Factores relacionados al mosquito.....	60
4.9.8.2. Factores ambientales.....	61
4.9.8.3. Factores relacionados al humano.....	62
4.9.8.4. Factores relacionados al virus.....	64
4.9.9. Sistemas de vigilancia.....	65
4.9.9.1. Vigilancia epidemiológica.....	65
4.9.9.2. Vigilancia entomológica.....	66
4.9.9.3. Prevención.....	66
4.9.9.4. Mosquitos <i>Ae. aegypti</i> infectados en	

campo.....	67
4.9.9.4.1. Asia.....	67
4.9.9.4.2. América.....	67
4.9.9.4.2.1. México.....	67
4.9.9.4.2.2. Sudamérica.....	68
4.9.9.5. Sistemas de información geográfica ....	69
(GIS) como herramientas en la vigilancia	
del dengue y para el control	
del vector .....	69
5. MÉTODOS.....	71
5.1 Área de estudio.....	71
5.2 Colecta de mosquitos.....	73
5.2.1. Colecta de datos.....	73
5.2.2. Homogenización de mosquitos.....	73
5.2.3. Técnica de RT-PCR.....	73
5.2.4. Extracción de RNA.....	73
5.2.5. Electroforesis en gel de agarosa.....	74
5.3 Tasa de infección.....	74
6. RESULTADOS.....	75
7. DISCUSIÓN.....	79
8. CONCLUSIONES.....	86
LITERATURA CITADA.....	87
RESUMEN BIOGRÁFICO.....	109
ARTICULOS PUBLICADOS.....	110

## LISTA DE TABLAS

<b>Tablas</b>	<b>Página</b>
1. Proteínas no estructurales de un flavivirus y sus principales funciones (Lescar & Lok 2014) .....	25
2. Clasificación de genotipos del DENV-1 y su distribución geográfica (2001).....	37
3. Clasificación de genotipos del DENV-2 y su distribución geográfica (Twiddy et al 2002).....	38
4. Clasificación de genotipos del DENV-3 y su distribución geográfica (Lanciotti 1994).....	39
5. Clasificación de genotipos del DENV-4 y su distribución geográfica (Lanciotti 1994).....	40
6. Comparativo de casos por dengue en el estado de Quintana Roo, 2011-2012 (DGE SSA).....	72
7. Distribución de hembras de <i>Ae. aegypti</i> colectadas en viviendas en los municipios de Benito Juárez y Othon P. Blanco, Quintana Roo, México. Septiembre-noviembre de 2012.....	76
8. Grupos de mosquitos, grupos positivos, mosquitos positivos, casas con mosquitos positivos y serotipos identificados en los municipios de Benito Juárez y Othon P. Blanco, Quintana Roo, México. Septiembre-noviembre de 2012.....	77

## LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Estructura de la cápside del virus del dengue (Khun et al 2002).....	23
2. Estructura y expression de proteínas del genoma de un Flavivirus (Flit 2009)	24
3. Genoma de un virus del dengue (Perrera y Khun 2008).....	27
4. Estructura del genoma viral del dengue y sus productos proteínicos (Clyde 2006).....	29
.	
5. Ciclo de replicación de un Flavivirus en una célula humana (Flit 2009).....	30
6. Factores que contribuyen a la diversidad genética de los DENV con sus dos secuencias evolutivas posibles (Holme & Burch 2000).....	35
7. Árbol de evolución mínima sin raíces para las secuencias de nucleótidos del Gen E completo de 554 Flavivirus (Ong 2000).....	36
8. Ciclo de vida de un mosquito <i>Aedes aegypti</i> (Méndez).....	47
9. Iceberg clínico del dengue (Méndez 2006).....	50
10. Clasificación de casos de dengue según la OMS (OMS 2009).....	51
11. Transmisión del virus del dengue por un mosquito <i>Aedes aegypti</i> (CDC)....	60
12. Electroforesis de los productos de RT-PCR sobre gel de agarosa al 2%. M: marcador molecular. C(-) control negativo. Serotipos D1, D2, D3, D4. Muestras (ocho) de mosquitos infectados colectados en Quintana Roo, 2012.	77

## LISTA DE GRAFICAS

<b>Gráfica</b>	<b>Página</b>
1. Proporción y total de serotipos del DENV identificados en México, 1978-2014 (DGE-INDRE SSA).....	<b>32</b>
2. Promedio anual de casos de dengue notificados a la OMS por los países endémicos, 1955-2010 (WHO 2012).....	<b>54</b>
3. Incidencia acumulada de los países más afectados en el mundo 2004-2010 (WHO 2012).....	<b>55</b>
4. Dengue en México, 1978-2014 (Méndez 2006, DGE SSA).....	<b>56</b>
5. Índice endémico del dengue en Quintana Roo (2012).....	<b>72</b>
6. Hembras de <i>Ae. aegypti</i> y hembras positivas capturadas en casas monitoreadas con el aspirador CDC y serotipos de DENV identificados en los municipios de Benito Juárez y Othón P. Blanco, Quintana Roo. Septiembre-noviembre de 2012.....	<b>76</b>

## LISTA DE MAPAS

<b>Mapas</b>	<b>Página</b>
1. Distribución mundial de los serotipos del dengue comparativamente entre 1970 y 2004 (Gubler 2006).....	<b>31</b>
2. El dengue camina: Dispersión del DENV-2 en México, 1999-2005 (DGE SSA).....	<b>33</b>
3. Distribución mundial del Aedes aegypti, (Becker 2012).....	<b>46</b>
4. Regiones y países en riesgo de transmisión de dengue (OMS 2008).....	<b>53</b>
5. Quintana Roo.....	<b>71</b>
6. Distribución espacial de las casas muestreadas, casas positivas y serotipos identificados DENV-1, DEV-2 y DENV-4, de las ciudades de Cancún y Chetumal (ArcGis10 Software, CA, USA).....	<b>75</b>

## NOMENCLATURA

DENV	Virus Dengue
DENV-1	Virus Dengue serotipo 1
DENV-2	Virus Dengue serotipo 2
DENV-3	Virus Dengue serotipo 3
DENV-4	Virus Dengue serotipo 4
FD	Fiebre Dengue
FHD	Fiebre Hemorrágica por Dengue
GIS	Sistema de Información Geográfica
IC	Intervalo de Confianza
KDa	kilo Dalton
OMS	Organización Mundial de la Salud
OPS	Organización Panamericana de la Salud
PEI	Período Extrínseco de Incubación
PII	Período Intrínseco de Incubación
RE	Retículo Endoplasmático
RNA	Ácido Ribonucleico
RT-PCR	Retrotranscripción de la Reacción en Cadena de la Polimerasa
SCHD	Síndrome de Choque por Dengue
SSD	Síndrome Shock por Dengue

## RESUMEN

De septiembre a noviembre del 2012, la Secretaria de Salud del estado de Quintana Roo reportó un brote de dengue. En total, informó 375 casos, de los cuales 177 fueron descritos como dengue clásico y 198 como dengue hemorrágico. Durante este periodo, se determinó la sensibilidad del monitoreo de poblaciones de mosquitos de *Aedes aegypti* como método complementario a la vigilancia conjuntamente con las autoridades correspondientes. Se muestrearon 569 viviendas donde se colectaron un total de 2,144 hembras *Ae. aegypti*, se utilizó un aspirador motorizado de espalda para las colectas. Se agruparon en 220 lotes para realizar la RT-PCR semi-anidada para DENV y los lotes positivos se analizaron individualmente. Cinco lotes (2.27%) fueron positivos para DENV. Posteriormente los mosquitos de dichos pools se sometieron de manera individual a una segunda RT-PCR para identificar la casa donde fueron colectados y de esta manera obtener la tasa de infección. El análisis individual de los lotes arrojó ocho mosquitos positivos: seis DENV-2, uno DENV-1, y uno DENV-4. Este último no fue reportado por el sistema de vigilancia epidemiológica en ese año. El promedio de hembras colectadas por casa fue  $3.77 \pm 5.71$  y la tasa de infección viral de *Ae. aegypti* 0.4%. La mayoría de las hembras colectadas (49%) se concentró en el 10% de las casas. Monitorear mosquitos *Ae. aegypti* infectados a DENV tiene un potencial para complementar el actual sistema de vigilancia clínica y entomológica

## ABSTRACT

Sensitivity of monitoring *Aedes aegypti* (L.) populations was determined to identify the distribution of dengue virus (DENV) during epidemics in Quintana Roo. From September to November 2012, we used a motorized aspirator to collect 2,144 female *Ae. aegypti* from 569 homes. These were grouped into 220 to use semi-nested RT-PCR for DENV, and positive groups were analyzed individually. Five groups (2.27%) were positive for DENV. Individual analysis yielded eight groups that tested positive, six with DENV-2, one DENV-1, and one DENV-4. The latter was not reported by the surveillance system that year. The mean number of female mosquitoes per household was  $3.77 \pm 5.71$ , and the rate of viral infection of *Ae. aegypti* was 0.4%. Most infected mosquitoes (49%) were concentrated in 10% of the houses. Monitoring *Ae. aegypti* infected with DENV has the potential to complement the current system of clinical and entomological surveillance

## 1. INTRODUCCIÓN

Dengue es una enfermedad viral transmitida de una persona enferma a una susceptible a través de la picadura de un mosquito hematófago. Los principales vectores de la enfermedad son *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus*. En América solamente ha sido demostrada la transmisión del Dengue a través de mosquitos *Ae. aegypti*. El agente etiológico es el virus Dengue que pertenece a la familia *Flaviviridae*, existen cuatro variantes serotipos 1, 2, 3 y 4 (CDC, 2010). La infección viral puede producir en sus formas más benignas un cuadro asintomático, cuadros de fiebre indiferenciada o Fiebre por Dengue (FD) (Gubler, 1998); o en sus formas más severas (conocido actualmente como Dengue severo OMS, 2013): Fiebre Hemorrágica por Dengue (FHD) o Síndrome de Choque por Dengue (SCHD), que son causadas por infecciones secundarias, con diferentes serotipos del virus del Dengue (Halstead, 2008).

En las últimas décadas ha aumentado la incidencia de casos de Dengue en el mundo. Más de 2,500 millones de personas —más del 40% de la población mundial— están en riesgo de contraer Dengue. La OMS calcula que cada año se producen entre 50 y 100 millones de infecciones por el virus Dengue en el mundo (OMS, 2013).

En el continente americano Dengue se considera como la enfermedad reemergente más importante y sus formas hemorrágicas son cada vez de mayor relevancia, debido al aumento progresivo en el número casos y de defunciones (DGE/SSA, 1997-2014). En México, la primera epidemia de FDH ocurrió en 1994. A partir de entonces, el número de casos de Dengue ha aumentado y la incidencia pasó de 5,220 casos en 2003 a 40,559 en 2007. Aunque en la actualidad circulan los cuatro serotipos, el número de muertes se ha mantenido alrededor o menos del 1% del total de casos de FDH. La OMS coloca a México en el quinto lugar de incidencia en América Latina. Lo anterior influido e intensificado por el cambio climático y las migraciones humanas (Gubler 2006).

Ante la ausencia de una vacuna efectiva y segura, la prevención y control de los brotes de Dengue dependen únicamente del control sobre el mosquito. Aún cuando los programas de vigilancia logren bajar las densidades del mosquito, el monitoreo entomológico directo como los índices aélicos (índice de casa, índice de recipiente e índice

de Breteau) no son indicadores sensibles para la prevención de epidemias (Chow *et al.* 1998; Méndez *et al.*, 2006).

La detección y serotipificación del virus Dengue en poblaciones del mosquito vector en regiones donde la enfermedad es hiperendémica, puede servir como un sistema de alerta temprana que ayude a monitorear tasas de infección, así como los diferentes serotipos dentro de las poblaciones vectoriales, ayudando a predecir epidemias tanto de FD, como de FHD a causa de la circulación concomitante de diferentes serotipos (Chung *et al.*, 2002; Philip y Tyagi, 2006). También se puede complementar la vigilancia virológica durante los periodos inter e intraepidémicos (Chow *et al.*, 1998; Sithiprasasna *et al.*, 2004). Este tipo de análisis permite posicionar al vector como elemento primario y necesario en el ciclo de transmisión durante las evaluaciones epidemiológicas (Liotta *et al.*, 2005).

El objetivo del presente estudio fue detectar la circulación de los diferentes serotipos del virus Dengue en poblaciones del mosquito *Ae. aegypti* en dos zonas urbanas de Quintana Roo, México. Esto permitiría una mejor comprensión de la dinámica de transmisión de la enfermedad en poblaciones del vector en las regiones de estudio, como un método complementario para aumentar la sensibilidad de la vigilancia del virus, ofreciendo una oportunidad para la prevención de brotes epidemiológicos.

## 2. HIPÓTESIS

Los incrementos en densidades poblacionales de *Ae. aegypti* en el ambiente doméstico están relacionados con incrementos en casos de Dengue en la población humana. Cuando esta relación se cumple, los insectos vectores actúan como centinelas pues se observan aumentos proporcionales en el número de hembras mosquito con infección natural al virus del Dengue. Esto se traduce en una mayor tasa de infección en el complejo vector-virus. Por otra parte, el rango de vuelo de menos de 100 m de *Ae. aegypti* es compensado cuando hay densidades elevadas del vector en las viviendas y eso explicará la dispersión horizontal de nuevos casos de Dengue desde la vivienda con el caso índice hasta casas cercanas en este rango de distancia de vuelo de las hembras *Ae. aegypti* infectadas con virus Dengue. Además, mostrar la sensibilidad al identificar la circulación de los diferentes serotipos del virus de Dengue en el mosquito vector *Ae. aegypti*, se podría correlacionar con la gravedad del brote epidémicos ya sea de Fiebre Dengue (FD) o Fiebre Dengue Hemorrágico (FDH) como un método complementario a la vigilancia actual del vector.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Objetivo general**

Demostrar la sensibilidad del método complementario para la vigilancia del virus Dengue, así como densidades poblacionales y tasa de infección del mosquito *Ae. aegypti*, colectados en ambientes domésticos y endémicos de la ciudad de Cancún, Quintana Roo, México.

#### **3.2. Objetivos específicos**

- Identificación molecular de los virus de Dengue circulantes en poblaciones de campo del vector *Ae. aegypti* y su serotipificación en zonas urbanas endémicas de Cancún, Quintana Roo, mediante RT-PCR.
- Estimación de densidades poblacionales de mosquitos adultos *Ae. aegypti* en domicilios de Quintana Roo, México.
- Determinación de la tasa de infección natural al virus del Dengue en las poblaciones domiciliarias de hembras *Ae. aegypti* en cada región de estudio

## 4. ANTECEDENTES

### 4.1. Aspectos generales

Dengue es transmitido por mosquitos y también son los arbovirus más prevalentes en regiones tropicales y subtropicales de Asia, Pacífico Sur, África, México, América Central y del Sur (Westaway, 1997; Gubler, 1997). Dengue es una enfermedad viral que se transmite a través de la picadura de un mosquito perteneciente al género *Aedes*, principalmente por la especie *Ae. aegypti*, en América, aunque también se ha asociado *Ae. albopictus*, vector secundario del dengue en Asia. Pero se ha propagado a la mayor parte de países en Las Américas y Europa debido al comercio internacional de neumáticos usados (que proporcionan criaderos al mosquito) y el movimiento de mercancías (por ejemplo, el bambú de la suerte) (Lambrechts 2010; Hawley, 1987; Vitek, 2014; Guha-Sapir 2005).

El dengue es un problema creciente para la Salud Pública mundial, debido a varios factores: como cambio climático, aumento de la población en áreas urbanas, la insuficiente provisión de agua potable que obliga a su almacenamiento en recipientes caseros habitualmente descubiertos, así como la inadecuada recolección de residuos y gran producción de recipientes descartables que sirven como criaderos al igual que los neumáticos desechados. A esto se suman el aumento de viajes y migraciones, fallas en el control del vector y la ausencia de una vacuna eficaz para prevenir la enfermedad (Tapia 2009; Tapia 2012; Guha-Sapir D, 2005). En años recientes, la transmisión ha aumentado de manera predominante en zonas urbanas y semiurbanas (OMS, 2012).

Se conocen cuatro serotipos del virus Dengue nombrados como DENV-1, DENV-2, DENV-3 y DENV-4 (Méndez 2006). La infección induce inmunidad protectora aparentemente por toda la vida al serotipo homólogo pero solo protección temporal contra los serotipos heterólogos (Rothman 2004; Kurane, 1992; Rigau 1998). Los cuatro serotipos de DENV han sido asociados tanto a FD como a FDH. El agravamiento de la enfermedad se ha asociado de acuerdo al serotipo y a infecciones secundarias (Martina *et al.*, 2009), ya que una reinfección con un serotipo diferente al que estuvo presente en una primera infección, tiende a desencadenar FHD. Durante una infección secundaria el gradiente de severidad de los serotipos varía y se considera que es en el siguiente orden: DENV2 > DENV3 > DENV1 > DENV4 (Guzmán 2013; Halstead 2007). Por lo tanto, la co-

circulación de diferentes serotipos de DENV en la misma área geográfica favorece los brotes de FHD, así como los movimientos globales de DENV entre diferentes áreas geográficas es uno de los principales factores que han aumentado las tasas de FD así como la emergencia del FHD en América Latina y Asia. Actualmente, los cuatro serotipos son endémicos en estas regiones (Guzman 2010; Kyle 2008).

Den gue es una prioridad de salud pública nacional, debido a los efectos sociales y económicos inmediatos que puede ocasionar, por los daños a la salud en grandes grupos de población expuesta y, entre otras razones, por el exceso en la demanda de consulta y los costos de atención que conlleva la prestación de los servicios para las instituciones, las familias y la comunidad (Undurraga 2015; Mackenzie 2004)

#### **4.2. Agente etiológico**

Familia *Flaviviridae* comprende virus de ARN con envoltura, de cadena (+), incluido el primer virus humano descubierto, el virus de la fiebre amarilla. Hay más de 50 especies virales, muchas de las cuales son transmitidas por vectores artopodos. Los Flavivirus causan una variedad de enfermedades humanas, como encefalitis y fiebres hemorrágicas. Incluidos en esta familia son los principales patógenos mundiales como el dengue, la encefalitis japonesa y el virus del Oeste del Nilo, así como una de las grandes amenazas la fiebre amarilla. La Familia Flaviviridae tiene cuatro Géneros: los Flavivirus, Hepacivirus, Pestivirus y los Pegivirus. El dengue pertenece al Género Flavivirus (Flint 2009; Lindenbach 2007).

Se han descrito cuatro tipos de virus del dengue altamente relacionados entre sí (serotipos), con la capacidad de causar el mismo cuadro patológico al infectar al hospedero humano. Producen un espectro de infección que va desde infecciones asintomáticas a una fiebre moderada conocida como Fiebre por Dengue (FD) hasta una enfermedad grave y en ocasiones fatal llamado Dengue Severo (DS) que incluye el Dengue Hemorrágico, Síndrome de Shock por Dengue y ataque a órganos y sistemas (Burke *et al.*, 1988; OMS 2010, CDC, 2010).

Los cuatro serotipos de los virus del Dengue designados como DENV-1, DENV-2, DENV-3 y DENV-4. La infección induce inmunidad protectora aparentemente por toda la vida al serotipo homologo pero solo protección temporal contra los serotipos heterólogos

(Kurane & Ennis 1992). Los cuatro serotipos de DENV han sido asociados con FD y FHD. El mecanismo responsable del FHD y sus variantes clínicas no está completamente entendido pero se acepta ampliamente que una infección secundaria es el principal factor de riesgo (Halstead, 1988). Por lo tanto, la co-circulación de diferentes serotipos de DENV en la misma área geográfica favorece los brotes de FHD, así como los movimientos globales de DENV entre diferentes áreas geográficas es uno de los principales factores que han aumentado las tasas de FD así como la emergencia del FHD en América Latina y Asia. Actualmente, los cuatro serotipos son endémicos en estas regiones.

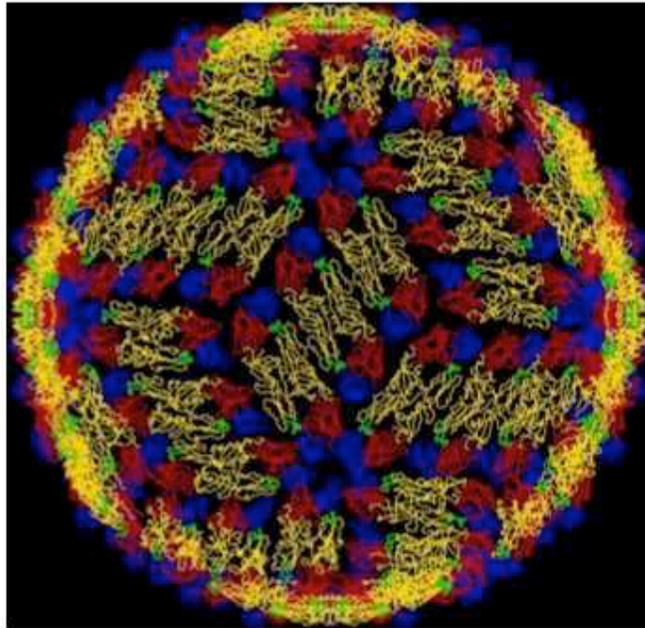


Figura 1. Estructura de la cápside del virus del dengue (Khun et al 2002)

## 4.2. Agente etiológico

### 4.2.1. Estructura del virión

El virus del dengue (DENV) es un virus ARN de sentido positivo con una envoltura lipídica. Su genoma de aproximadamente 11 kb codifica tres proteínas estructurales (cápside, prM y E) que forman las envolturas protectoras del virus que encapsulan ARN, y siete proteínas no estructurales (NS) (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B y NS5). Estos últimos están principalmente involucrados en la replicación del ARN viral (Lindenbach y

Rice, 2003; Lescar & Lok; 2014). Estas estructuras son fundamentales para que el virus consiga su ciclo de vida y sus conformación y funciones son las siguientes:

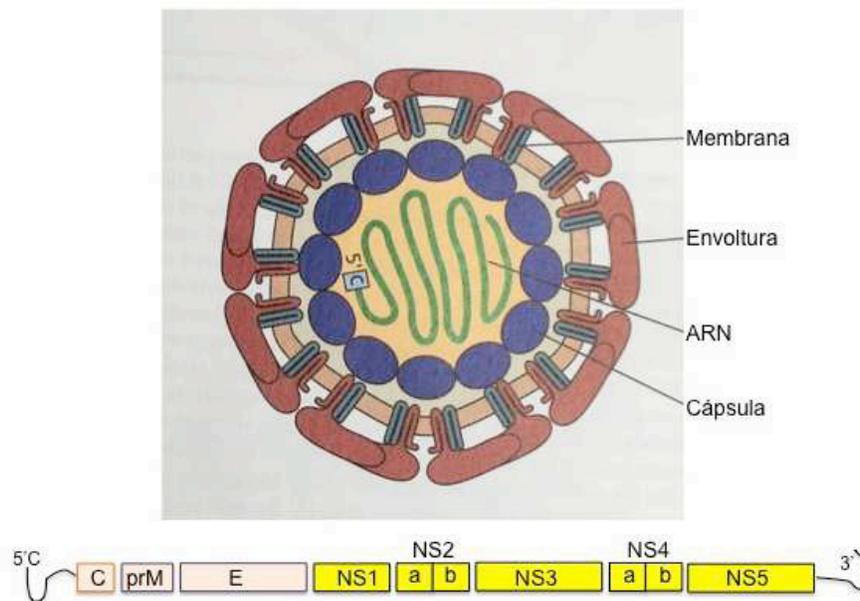


Figura 2. Estructura y expresión de proteínas de un genoma de un Flavivirus.

## Proteínas estructurales

### Proteína Capsid

La cápside (12 kDa) es una proteína básica altamente cargada. Se detecta tanto en el citoplasma como en el núcleo (Sangiambut et al., 2008). El papel principal de la cápside en el citoplasma es ensamblar partículas de virus mediante la interacción con el genoma de ARN viral y la membrana del retículo endoplásmico (Markoff et al., 1997). El papel de la proteína de la cápside en el núcleo, por otro lado, es desconocido; se muestra que interactúa con algunas proteínas nucleares (por ejemplo, histonas, nucleolar RNA helicasa, importin- $\alpha$  /  $\beta$ ) (Xu et al., 2011) y es capaz de causar apoptosis ( Yang et al., 2002; ).

### Proteína de envoltente (E)

La proteína E es la principal estructura antigénica en DENV. Está involucrado tanto en el reconocimiento del receptor de la célula huésped como en la fusión del virus a la membrana endosomal durante la entrada de la célula (Rey et al., 1995). La proteína E está

presente como dímeros y cuando se expone a un pH bajo, que imita la condición en el endosoma, la proteína E se reorganiza (Bressanelli et al., 2004; Modis et al., 2004). Se habían resuelto varias estructuras cristalinas de ectodominio de flavivirus E a pH neutro (Modis et al., 2003; Luca et al., 2011). La mayoría de las estructuras cristalinas de la proteína E son dímeros. La proteína E es una proteína alargada compuesta principalmente de cadenas  $\beta$ . Está organizado en tres dominios: el dominio central I, el dominio de dimerización II y el tipo IgCdominio III. Cada dímero se ensambla a partir de dos monómeros dispuestos en un formato de cabeza a cola. La punta del dominio II contiene el bucle de fusión, que interactúa con la membrana endosomal durante el evento de fusión. Una comparación de las estructuras de cristal y cryoEM mostró que la bisagra entre el dominio I y II es flexible (Zhang et al., 2004). Por lo tanto, se cree que la bisagra es importante para la flexión del dominio II de la proteína E, para exponer el circuito de fusión durante la fusión del virus con la membrana endosomal. El dominio III, por otro lado, está involucrado en la unión al receptor.

#### **precursor Membrana (prM) y proteína de membrana (M)**

La proteína prM está presente en la superficie del virus inmaduro recién sintetizado, mientras que su derivado de proteasa de furina, la proteína M, está presente en el virus infeccioso maduro. La proteína prM consiste en una molécula pr de N-terminal de 91 residuos seguida por un ectodominio de 38 residuos y una región TM de 35 residuos (Li et al., 2008). Se detecta un sitio de escisión de proteasa furina en la unión entre la molécula pr y la molécula M. El papel principal de la molécula pr es limitar el bucle de fusión de la proteína E, evitando así que el virus recién sintetizado se fusione de nuevo en la célula, cuando se mueve a través de los compartimentos ácidos de la red trans-Golgi. Por otro lado, la función de la proteína M sigue siendo en gran parte desconocida.

**Tabla 1. Proteínas no estructurales y sus principales funciones (Lescar and Lok, 2014):**

NS1:	Cofactor para la replicación del ARN viral y Antagonista de la activación del complemento
NS2A:	involucrado en la replicación del ARN viral; Inhibición de la señalización del

	interferón $\alpha / \beta$ ; Ensamblaje del virus; Participación en la biogénesis de membranas inducidas por virus (Mackenzie et al., 1998; Liu et al., 2003; Liu et al., 2005; Muñoz-Jordania; Kummerer y Rice, 2002; Liu et al., 2003; Leung et al., 2008; Leung et al., 2008)
Cofactor NS2B:	para la actividad proteolítica NS3 (Li et al., 1999; Erbel et al., 2006)
Proteasa NS3	Escisión de la poliproteína precursora viral (Bazan y Fletterick, 1989; Preugschat et al., 1990)  Proteasa - Inhibición de la respuesta al interferón tipo I (Rodríguez-Madoz et al., 2010)  Helicase (Warrener et al., 1993; Li et al., 1999)  RNA / DNA Triphosphatase (Wengler, 1991)  Reclutamiento y estimulación de ácido graso sintasa (FASN) (Heaton et al., 2010)  Conjunto de virus Virus assembly (Chiou et al., 2003; Kummerer y Rice, 2002; Patkar y Kuhn, 2008; Carpp et al., 2011)
NS4A:	Función en la replicación de ARN (Lindenbach y Rice, 1999; Jiang et al., 2009)  Inducción de alteraciones de membrana (Miller et al., 2007)  Upregulation of autophagy (McLean et al., 2011)  Inhibición de señalización de interferón $\alpha / \beta$ ( Muñoz-Jordan et al., 2005)
NS4B	Disociación de la helicasa NS3 del ARN monocatenario (Umareddy et al., 2006)  Inhibición de la señalización del interferón $\alpha / \beta$ (Muñoz-Jordan et al., 2005)  ARN polimerasa ARN dependiente de NS5 (Bartholomeusz y Wright, 1993)  Metiltransferasa (Egloff et al., 2002)

	Guaniltransferasa (Issur et al., 2009) Unión y degradación de STAT2 (Ashour et al., 2009)
NS5	(Bartholomeusz y Wright, 1993) Metiltransferasa ( Egloff et al., 2002) Guanililtransferasa (Issur et al., 2009) Unión y degradación de STAT2 (Ashour et al., 2009)

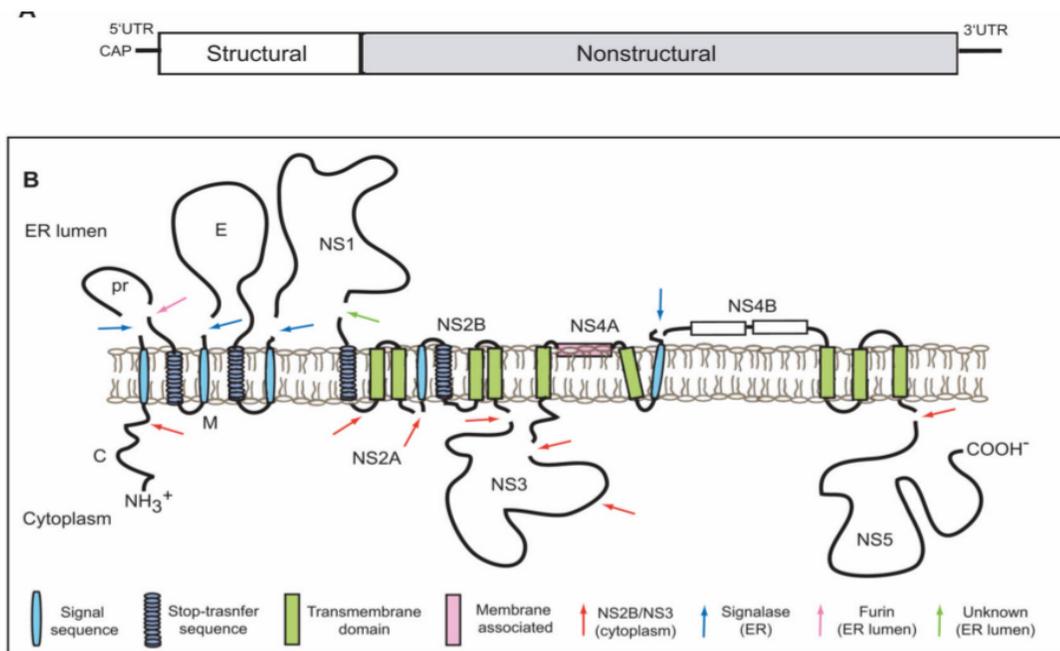


Figura 3. Genoma viral Dengue (Perera y Kuhn, 2008)

#### 4.2.2. Replicación y ensamble de las partículas virales.

El virus del dengue ingresa a una célula huésped a través del desencadenamiento mediado por receptores de la vía endocítica (van der Schaar et al., 2008). A medida que los viriones endocitados se transforman en los endosomas tempranos y tardíos, la acidificación gradual de estos compartimentos desencadena un cambio de conformación dependiente del pH en la proteína de la envoltura viral (van der Schaar et al., 2008). La redistribución estructural resultante de las proteínas E de la superficie del virión y la exposición de los dominios hidrofóbicos favorecen la fusión de la envoltura viral y las membranas

endosomales del huésped. Este evento de fusión da como resultado la liberación de la nucleocápside viral en el citoplasma de la célula.

Teniendo en cuenta el desorden celular intenso que ocurre después de la infección por el virus del dengue en una célula, es sorprendente que los cambios celulares observados sean conducidos por solo siete proteínas no estructurales codificadas por virus. Las secuencias de estas proteínas han sido optimizadas por la mano esculpida de la evolución en miles de millones de rondas de replicación viral. Numerosas funciones se llevan a cabo por cada proteína no estructural y muchas, si no todas, de estas proteínas son capaces de interactuando con factores de células anfitrionas. Hasta la fecha, se han identificado varias de estas interacciones, y no cabe duda de que se seguirán identificando otros socios que interactúen en los próximos años. Tales interacciones desencadenan la corrupción de las vías celulares normales a favor de la replicación viral, incluida la estimulación de la  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos libres para satisfacer los requisitos energéticos de la replicación viral, el secuestro de ribosomas para la traducción de proteínas virales y el antagonismo del huésped respuesta inmune innata y adaptativa para evadir el reconocimiento.

Además, las proteínas no estructurales inducen una proliferación de la membrana extendida a lo largo del citoplasma y la inducción de la curvatura de la membrana con el fin de formar estructuras para crear las fábricas de replicación viral. Se cree que el entorno local dentro de estas estructuras membranosas es óptimo para las principales funciones enzimáticas de las proteínas no estructurales, lo que les permite llevar a cabo el procesamiento del polipéptido vírico, la replicación del ARN genómico viral y la formación de viriones de la progenie. a través de la gemación de la nucleocápside viral a través de la bicapa lipídica. Se cree que las siete proteínas no estructurales se asocian para formar un complejo responsable de la replicación del ARN genómico viral. Las dos proteínas no estructurales más grandes, NS3 y NS5, codifican las principales funciones de la enzima para la replicación del ARN y la formación de la estructura cap 5 'de modo que los ribosomas anfitriones reconozcan el ARN viral de sentido positivo para iniciar la traducción.

Si bien la capacidad de las siete proteínas no estructurales del virus del dengue para subvertir las funciones celulares normales es impresionante, sus funciones únicas también

ofrecen el potencial para la inhibición. El correcto funcionamiento de cada una de estas proteínas es necesario para la replicación viral y, por lo tanto, se espera que su alteración supere la replicación. A medida que avanza nuestra comprensión de los mecanismos moleculares implicados en la replicación del virus del dengue, es probable que se identifiquen nuevos roles para las proteínas no estructurales.

Tras la infección de una célula huésped, el genoma del virus del dengue es reconocido por los ribosomas de la célula hospedadora y se traduce inicialmente en el retículo endoplásmico rugoso. Los productos expresados estimulan la biosíntesis de ácidos grasos de las células hospedadoras (Heaton et al., 2010) e inducen una reorganización importante de las membranas celulares en compartimentos separados que alojan la replicación del ARN viral y el procesamiento de la poliproteína viral (Westaway et al., 1997b, 1999). La enzima sintasa de ácidos grasos del huésped (FASN) se recluta en los sitios de replicación viral a través de una interacción con NS3 (Heaton et al., 2010). NS4A y posiblemente también NS2A son parte integral de la remodelación de la membrana, lo más probable es que al inducir la curvatura, forme las estructuras necesarias para la replicación viral (Milleret et al., 2007; Leung et al., 2008).

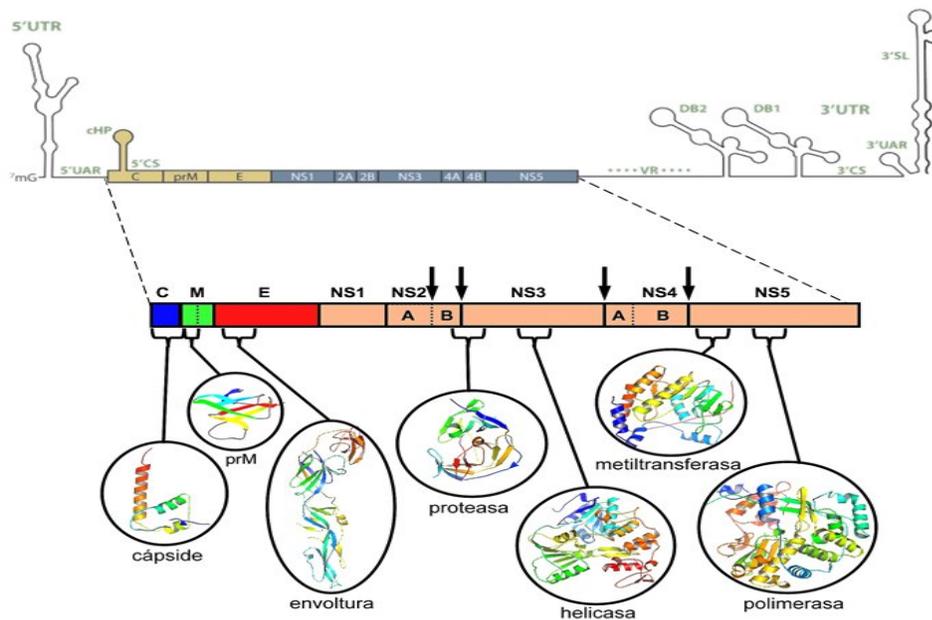


Figura 4. Estructura del genoma viral del dengue y sus productos proteicos (Clyde *et al*, 2006).

Sobre la traducción, las proteínas no estructurales (NS) inician la replicación del genoma viral. De éstas, las mejor caracterizadas son la NS3, su cofactor NS2B y la NS5. La NS3 alberga dominios catalíticos, incluyendo serin-proteasas, los cuales requieren el cofactor NS2B (Arias *et al.*, 1993; Falgout *et al.*, 1991). También exhibe función helicasa requeridas para la síntesis del RNA viral, así como de actividad 5' trifosfatasa, el cual es el primer paso en la metilación de los RNA mensajeros (Bartelma & Padmanabhan, 2002). La proteína NS5 sirve como la RNA polimerasa viral dependiente de RNA (Nomaguchi *et al.*, 2003), así como metiltransferasa, otra enzima esencial en la metilación del RNA mensajero (Clyde *et al.*, 2006).

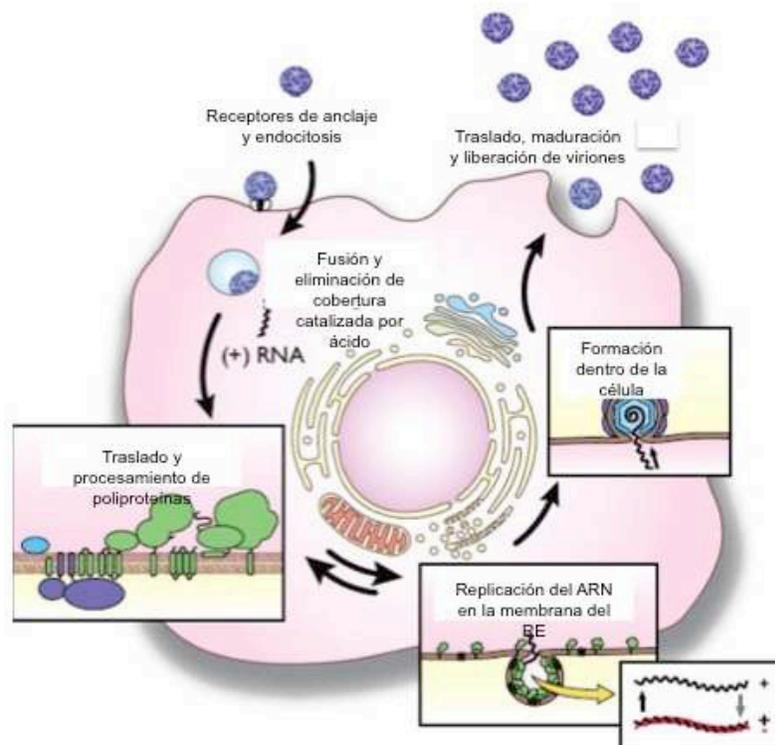


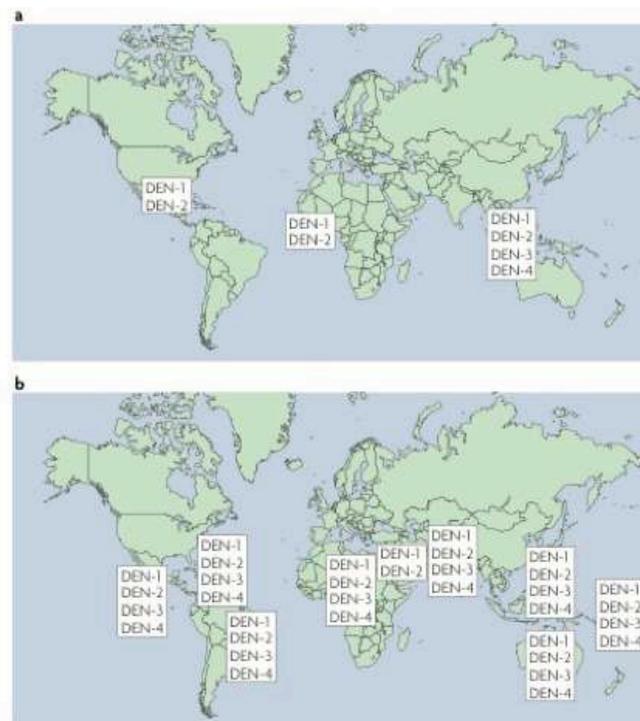
Figura 5. Ciclo de replicación de un Flavivirus en una célula de un mamífero (Flit 2009)

El virión se enlaza con los receptores de la membrana celular y se produce la endocitosis de esa forma se libera la cadena (+) de ARN dentro del citoplasma. Este ARN es llevado al retículo endoplásmico en donde los ribosomas lo identifican y lo integran para la transcripción y replicación de nuevas cadenas que contienen las proteínas no estructurales, las cuales se invaginan en la membrana del retículo endoplásmico

formandose las proteínas C, prM y E de un virión inmaduro. Este virión migra al aparato de Golgi donde se lleva a cabo su proceso de maduración para después migrar a la membrana celular y liberarse fuera de la célula. En todo este proceso se involucran las proteínas no estructurales del ARN viral, como se explicó en párrafos previos.

Una representación esquemática del genoma viral y traducción de las proteínas virales están descritas en la figura 2. Después de que el virus entra a la célula y se desnuda del genoma viral. Durante este proceso, la señal de la poliproteína dirige su traslocación a través de la membrana del retículo endoplasmático (RE). La poliproteína es procesada post-traduccionalmente por las proteasas virales y celulares en tres proteínas estructurales (C, prM y E) y siete no estructurales (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B y NS5). La proteína E tiene glicosilados los residuos Asn67 y Asn153 para asegurar un adecuado plegamiento de la proteína (Modis *et al.*, 2003; Bryant *et al.*, 2007).

### 4.3. Distribución de serotipos

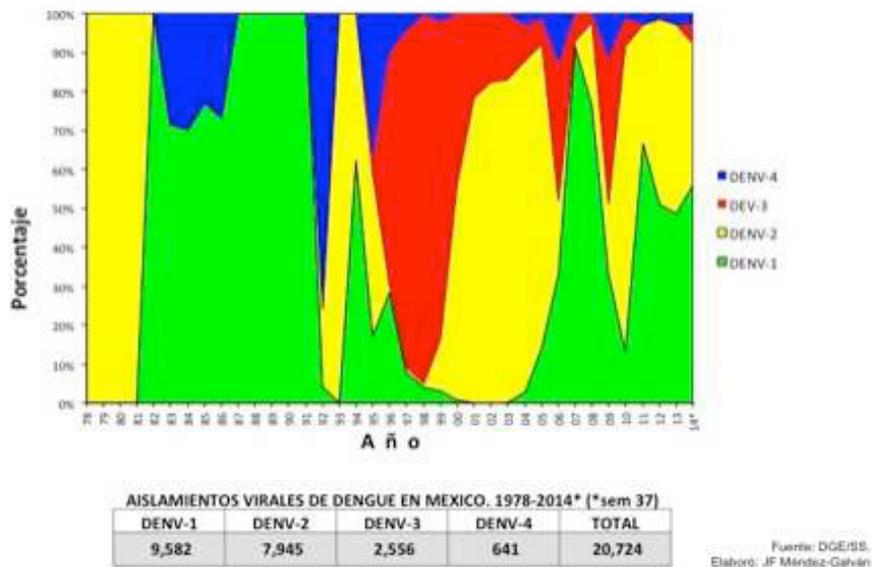


Mapa 1. distribución mundial de los serotipos del dengue comparativamente entre a) 1970 y b) 2004 (Gubler 2006)

A nivel mundial los serotipos del dengue se han dispersado en forma muy alarmante, sobre todo si sabemos que después de una primoinfección puede desarrollarse un cuadro clínico severo. Inicialmente la distribución de los serotipos al ser pocos, tardaban en producir epidemias debido a que una vez que un serotipo producía un brote, el siguiente serotipo podría tardar dependiendo de los movimientos migratorios y del desarrollo de vías de comunicación y formas de transporte más eficientes. Por esta razón los serotipos tienen una distribución estática, se van alternando los serotipos de acuerdo a la migración de la población y debido a las facilidades de las vías de comunicación.

Por eso, en la actualidad la dispersión de los serotipos es mundial en todos los sitios endémicos y la sucesión de los serotipos es la causante de brotes de dengue hemorrágicos más intensos y permanentes.

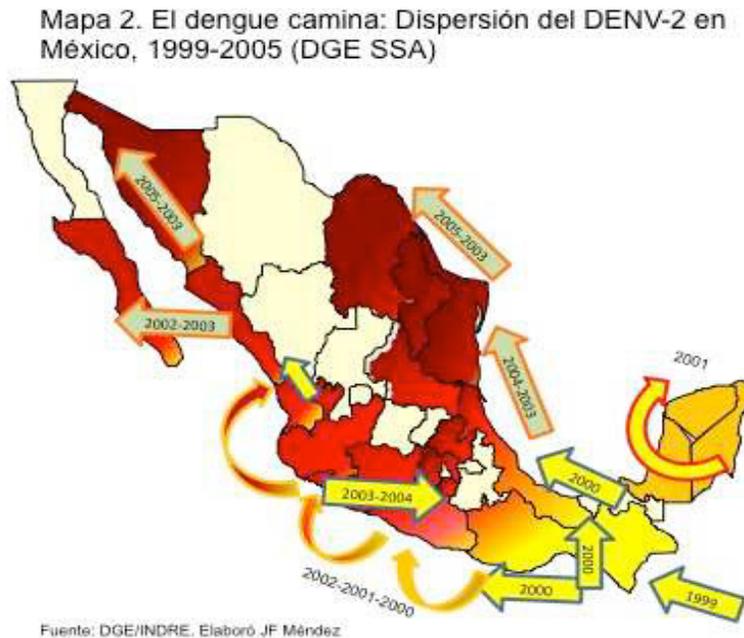
México no es la excepción y los cuatro serotipos están presentes desde 1997.



Gráfica 1. Proporción y total de serotipos del DENV identificados en México, 1978-2014 (DGE-INDRE SSA)

Igualmente la presencia de los serotipos tiene un desplazamiento que va siguiendo los movimientos de las personas, como es el caso del DENV-2 en México que se pudo

ejemplificar su reaparición en 1999 en el estado de Chiapas, puerta de entrada de los principales movimientos migratorios de la Región Mesoamericana y que fue siguiendo la ruta que siguen los migrantes hasta la frontera norte que llegó en 2005, es decir, tardó 6 años en lograr cruzar el país produciendo brotes intensos.



#### 4.3.1. Variación de Virus Dengue entre serotipos

Los Flavivirus fueron los primeros agrupados como arbovirus del Grupo B basados en la inhibición de la hemaglutinación entre especies (Casals y Brown, 1954; Westaway y Blok, 1997) y luego divididos en ocho serocomplejos compuestos por 49 virus sobre la base de pruebas de neutralización cruzada (Calisher et al. 1989).

Los serocomplejos corresponden a las distancias de aminoácidos sobre la proteína E: sus similitudes, aproximadamente el 40% de identidad de aminoácidos en E, se concentran en el interior de la proteína en lugar de las superficies externas expuestas, lo que explica la falta de protección cruzada entre ellos (Heinz y Stiasny, 2012).

Los serocomplejos en sí presentan en diferentes grados de similitud antigénica. Dentro del serocomplejo del dengue de los serotipos 1-4 descritos actualmente, la proteína E consiste en regiones conservadas y variables, con hasta un 37% de divergencia de

aminoácidos (Heinz y Stiasny, 2012a). La presencia de regiones conservadas explica la protección cruzada breve (del orden de los meses) entre serotipos (Sabin, 1952) y la disminución y / o neutralización de los anticuerpos de reacción cruzada que contribuyen a la enfermedad grave en el dengue a través de la mejora dependiente de anticuerpos. de infección (Halstead et al., 1970; Kurane et al., 1991; Green y Rothman, 2006). Al final, el grado de variabilidad en la proteína E y la diferenciación serológica resultante entre el dengueserotipos significa que no hay protección cruzada para la segunda, tercera o cuarta infección, aunque la enfermedad clínica es leve en las infecciones tercera y cuarta (Halstead et al., 1973a, b; Gibbons et al., 2007). La proteína E es el objetivo principal para neutralizar la formación de anticuerpos debido a su papel crítico en la endocitosis y la fusión mediadas por receptores de células hospedadoras (Pierson et al., 2008; Wahala y de Silva, 2011).

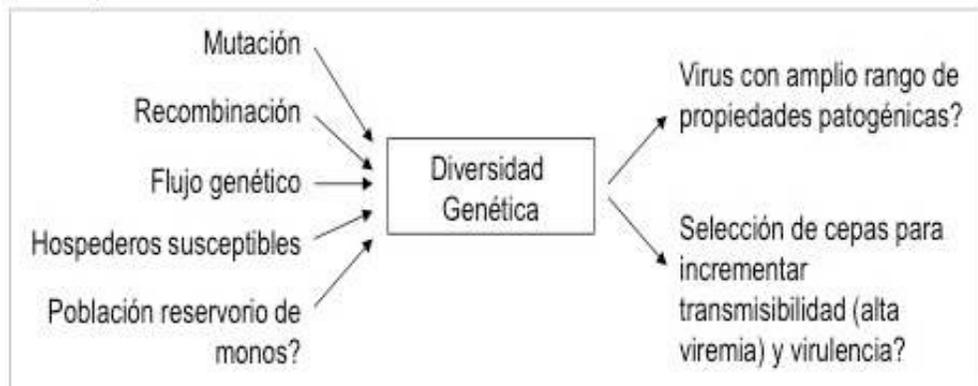
La enorme diversidad de flavivirus y taxones asociados en términos de propiedades filogenéticas, antigénicas, biológicas y ecológicas plantea un desafío en la reconstrucción de las rutas evolutivas que los han configurado. Los problemas surgen en parte de la tasa de crecimiento explosivo del género en términos de nuevos virus candidatos, muchos de los cuales no han sido completamente caracterizados y algunos de los cuales son tan divergentes como para mantener posiciones filogenéticas inciertas (por ejemplo, TABV). Además, el alto grado de divergencia entre los tres géneros y géneros propuestos dentro de la familia Flaviviridae hace que sea difícil inferir estados ancestrales para ciertos nodos, como asociaciones de vectores y / o anfitriones. Hipótesis emergentes para las rutas evolutivas la conformación de la diversidad de flavivirus y sus historias de vida incluyen (i) un origen de insecto y (ii) un origen de vertebrado:

Los flavivirus, de los cuales el virus del dengue ha sido un miembro temprano e importante en términos de causar enfermedades humanas, abarcan un grupo muy diverso de virus con una amplia gama de asociaciones ecológicas, de hospedadores y / o vectores. Con intensos esfuerzos de vigilancia de campo y nuevas herramientas moleculares, el género ha estado explotando con nuevos virus candidatos que impactan enormemente nuestra comprensión de las trayectorias evolutivas en el grupo. Los nuevos descubrimientos más importantes han venido de los mosquitos. Para resolver completamente los orígenes y los controladores adaptativos de la diversificación de los flavivirus, incluido su potencial para

causar enfermedades humanas, los descubrimientos en curso deben combinarse con una comprensión más profunda de la biología detrás de los flavivirus familiares y novedosos.

Sobre la base de datos moleculares disponibles, se conoce que existe una gran diversidad genética entre los virus de DENV. Los factores que contribuyen a esta diversidad son varias, generando consecuencias epidemiológicas.

Figura 6. Factores que contribuyen a la diversidad genética de los DENV con sus dos secuencias evolutivas posibles (Holmes & Burch 2000)



Generalmente los cuatro serotipos del dengue son tratados como el mismo virus y las presentaciones clínicas que causan son consideradas como la misma enfermedad. Sin embargo, las distancias genéticas entre los cuatro serotipos son mayores que las distancias entre muchas de las especies de virus reconocidas en el género, por ejemplo, entre el virus de la encefalitis japonesa (JEV), virus del Nilo Occidental (VON), virus de la encefalitis del Valle Murray (MVEV), virus Usutu (USUV) y virus Encefalitis de San Louis (VESL).

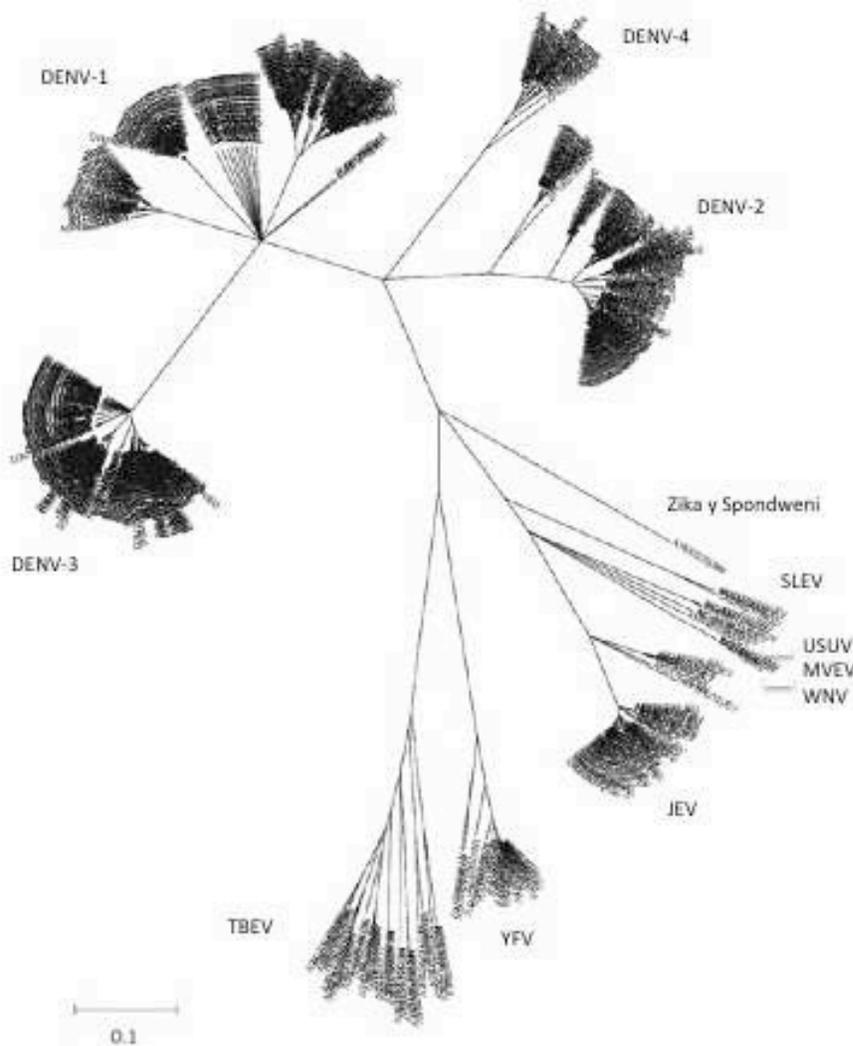


Figura 7. Árbol de evolución mínima sin raíces para las secuencias de nucleótidos del gen E completo de 554 flavivirus (datos no publicados). Las distancias genéticas entre los cuatro serotipos del dengue son mayores que las distancias entre las muchas especies dentro de la encefalitis transmitida por garrapatas y los complejos antígenicos de la encefalitis japonesa.

Basado en esta observación, varios autores han argumentado que los cuatro serotipos del DENV tendrían que ser considerados especies diferentes (Kuno et al., 1998; Holmes and Burch, 2000).

#### 4.3.2. Genotipos del DENV

Los serotipos del virus dengue pueden ser clasificados en varios grupos genéticos denominados genotipos (también se utiliza el término subtipo en forma indistinta) basados

en la diversidad de secuencias genéticas.

Inicialmente se estableció genotipos para DENV-1 y DENV-2 a los grupos de virus que no tuvieran más de 6% de divergencia nucleotídica para una región de 240 nucleótidos de la E/NS1 (Rico-Hesse, 1990). Desde entonces, tanto el tamaño y región del genoma del virus sirven para establecer genotipos y varían en función de los grupos de investigación, los criterios pueden ir desde secuencias completas de genes hasta genomas completos del DENV. Ahora la asignación de genotipos se basa en el análisis filogenético en lugar de arbitrarios valores de corte de la diversidad de la secuencia nucleotídica. Se ha publicado una descripción detallada de la clasificación de genotipos de los cuatro serotipos del DENV (Rico-Hesse, 2003; Vasilakis, et al., 2011).

#### **a) Genotipos del serotipo DENV-1**

DENV-1 está dividido en cinco genotipos: I, II, III, IV y V (Tabla 2), esta clasificación se basa en las secuencias de 240 nucleótidos de la unión E/NS1 (Rico-Hesse, 1990) y gen completo de Envoltura (Gonçalves et al., 2001).

**Tabla 2. Clasificación de Genotipos del DENV-1 de acuerdo a Gonçalves et al., (2001)**

<b>GENOTIPOS</b>	<b>DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA</b>
I	Japón, Hawaii en 1940s (cepa prototipo), China, Taiwán y Sudeste asiático
II	Tailandia en los 1950s y 1960s
III	Área selvática de Malasia
IV	Nauru, Australia, Indonesia y Las Filipinas
V	África, Sudeste asiático y América.

Los genotipos del DENV-1 tienen una amplia distribución en el mundo excepto el genotipo II (cepas de Tailandia de la década de 1950s y 1960s) y el genotipo III (selvático). Los genotipos I y IV recientemente han causado brotes epidémicos en el Pacífico, 2000 - 2004 (Nuegoonpipat et al., 2004), el genotipo V causa frecuentemente epidemias en el continente americano. Sin embargo no se puede concluir cuál de estos tres genotipos (I, IV y V) es el que está más asociado a los casos graves de dengue (Rico-Hesse, 2003).

## b) Genotipos del serotipo DENV-2

Se ha propuesto la clasificación de seis genotipos para DENV-2 en base a las secuencias de 240 nucleótidos de la unión E/NS1 (Rico-Hesse, 1990) y al gen completo que codifica la proteína de la Envoltura (Lewis et al., 1993; Twiddy et al., 2002). Las cepas selváticas aisladas de varios países de África Occidental y Malasia están estrechamente relacionadas, pese a la distancia geográfica (Wang et al., 2000) llegando a la hipótesis de un ancestro selvático de DENV en la región de Asia-Oceanía mucho antes de la divergencia en cuatro serotipos de DENV que existen actualmente (Tabla 3).

La primera epidemia de dengue hemorrágico (FDH) en las Américas se produjo después de la introducción del genotipo asiático a Cuba en 1981 (Guzmán et al., 1995). Asimismo, el genotipo América/Asia (genotipo III) sustituyó al preexistente genotipo americano (genotipo V) en el hemisferio Occidental (Rico-Hesse et al., 1997) y se considera actualmente que es el genotipo del DENV-2 con mayor impacto epidémico (Rico-Hesse, 2003).

Tabla 3. Clasificación de Genotipos del DENV-2 de acuerdo a Twiddy et al (2002)

GENOTIPOS	DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA
Asia I	Tailandia, Myanmar y Malasia.
Asia II (subtipo I y II)	China, Las Filipinas, Sri Lanka, Taiwan y Vietnam. (Incluye la cepa prototipo New Guinea C).
América/Asia (subtipo III)	China, Vietnam, Tailandia y América Latina desde 1980.
Cosmopolita (subtipo IV)	Australia, Islas del Pacífico, Sudeste asiático, India, islas del Océano Índico, Oriente Medio, Este y Oeste de África.
Americano (subtipo V).	América Latina, Cepas antiguas de la India (1975), El Caribe y las islas del Pacífico entre 1950s y 1970s.
Selvático	Aislado de primates no humanos en el África Occidental y Malasia.

## c) Genotipos del serotipo DENV-3

DENV-3 se clasifica en cuatro genotipos DENV-3 (I, II, III, IV) sobre la base de las secuencias nucleotídicas de la región PrM/E (Lanciotti et al., 1994) y una región de 195 nucleótidos en el extremo 5' del gen E (Chungue et al., 1993) (Tabla 4).

Introducido a América a través de Nicaragua en 1994, el genotipo III ahora se encuentra ampliamente disperso en Centro y Sur América (Balmaseda et al., 1999; Usuku et al., 2001; Messer et al., 2003) y es considerado el más virulento de los cuatro genotipos de DENV-3.

Se debe mencionar que el genotipo IV nunca se ha asociado con ninguna epidemia de dengue hemorrágico (Lanciotti et al., 1994). Aunque se tiene evidencia de la presencia de anticuerpos contra DENV-3 en primates no humanos, hasta ahora no se han encontrado linajes selváticos de DENV-3 (Rudnick, 1984).

Tabla 4. Clasificación de Genotipos del DENV-3 de acuerdo a Lanciotti et al (1994)

GENOTIPOS	DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA
I	Indonesia, Malasia, Tailandia, Birmania, Vietnam, Filipinas y el sur de las islas del Pacífico (Polinesia Francesa, Fiji y Nueva Caledonia). Incluye la cepa prototipo H87
II	Tailandia, Vietnam y Bangladesh.
III	Singapur, Indonesia, islas del Pacífico Sur, Sri Lanka, India, África y Samoa.
IV	Puerto Rico y la Polinesia Francesa (Tahiti).

#### d) Genotipos del serotipo DENV-4

Se clasifica en cuatro genotipos: I, II, III y selvático. Se identificó los genotipos I y II basados en los estudios de la secuencia completa del gen E (Lanciotti et al., 1997), posteriormente describe el genotipo III que solo se encuentra en Bangkok, Tailandia (Klungthong et al., 2004), el genotipo selvático se encuentra en primates no humanos en Malasia.

El genotipo II está ampliamente disperso respecto a los otros genotipos, su introducción al continente americano se produjo en 1981, posiblemente a través de las islas

del Pacífico (Lanciotti et al., 1997; Foster et al., 2003). Aunque DENV-4 es el serotipo detectado con menos frecuencia, está asociado con la fiebre hemorrágica durante la infección secundaria (Vaughn, 2000).

Tabla 5. Clasificación de Genotipos del DENV-4 y su distribución mundial

GENOTIPOS	DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA
I	Tailandia, Malasia, Filipinas y Sri Lanka. (incluye la cepa prototipo H241).
II	Indonesia, Malasia, Tahití, Islas del Caribe (Puerto Rico y República Dominicana) y las Américas.
III	Tailandia (Bangkok).
Selvático	Aislada de los primates no humanos en Malasia.

#### 8.4. Casos de Dengue en México

En el 2009, el Centro Nacional de Vigilancia Epidemiológica (CENAVECE) registró el número más alto de casos de Dengue Clásico (44,565) y Hemorrágico (11,396) en los últimos 10 años: 55,961 casos totales (con 96 defunciones). Durante el 2010, se registraron 30,156 casos de Fiebre Dengue y 6,548 Fiebre Dengue Hemorrágica, con 62 defunciones, circulando los 4 serotipos registrados. En el 2011, se reportaron 15,578 casos de los cuales 10,970 se clasificaron como Fiebre dengue y 4,608 FDH, con 36 defunciones. En cuanto al 2012, se dio un marcado incremento en los casos cerrando el año con 50,368 casos de los cuales 32,662 se diagnosticaron como Fiebre por Dengue y 17,706 como Fiebre Hemorrágica por Dengue, con 170 muertes. Durante el 2013 se reporto un incremento respecto al 2012 con 62,330 casos de los cuales se clasificaron 18,667 como Fiebre Hemorrágica por Dengue y 43,663 como Fiebre por Dengue, sumando a estos datos 104 fallecimientos. Respecto al 2014, a la semana 29 están reportados 7,591 casos de los cuales están clasificados 2,264 como Fiebre Hemorrágica por Dengue y 5,327 Fiebre por Dengue, sin defunciones, aunque debemos considerar que los picos que se reportan en este padecimiento son a partir de septiembre. Por lo tanto, esto nos habla de la gravedad de esta

enfermedad y representa una amenaza para la salud pública de México. Una explicación es la falta de investigación sobre la epidemiología molecular de los virus circulantes en el país y su asociación con poblaciones genéticamente aisladas del vector *Ae. aegypti* (CENAVECE, 2014).

#### **4.5. *Ae. aegypti* como vector**

La prevención efectiva de enfermedades transmitidas por vectores requiere la comprensión de la dinámica en poblaciones de vectores de artrópodos y la aplicación de ese conocimiento para interferir o prevenir la transmisión de patógenos. Un vector puede afectar la transmisión a través de diferencias en su distribución, la dispersión, la abundancia, el comportamiento o la genética; todos los cuales son factores que tienen efectos bien documentados sobre la distribución de la infección y enfermedad en la población a través del tiempo y el espacio (Woolhouse et al., 1997; Lloyd-Smith et al., 2005). Los estudios teóricos y empíricos de las heterogeneidades en las enfermedades transmitidas por vectores indican que la monitorización e intervención específicas tienen un mayor impacto en la reducción de la enfermedad que las aplicaciones uniformes en las poblaciones afectadas (Woolhouse et al., 1997; Lloyd-Smith et al., 2005) La implicación de esta observación en la salud pública es que los patrones desiguales de infección deben tenerse en cuenta en el diseño de programas de control y vigilancia de enfermedades. Esto es especialmente cierto en situaciones endémicas de recursos limitados que a menudo soportan la mayor carga de morbilidad. El desafío es primero definir las contribuciones relativas de diferentes fuentes de heterogeneidad y luego determinar si la información operacionalmente relevante sobre los componentes clave de la variación puede obtenerse y aplicarse con sensatez. En este capítulo discutimos cómo la contabilidad de la variación en las poblaciones de vectores se puede aplicar para mejorar la prevención del dengue.

##### **4.5.1 Oviposición y hábitats larvarios**

Aunque estos pueden ser hábitats naturales, como bromelias y agujeros de árboles, entre otros, los contenedores artificiales representan el hábitat larvario más común para *Ae. aegypti* (Rodhain & Rosen, 1997). Los hábitats más comúnmente citados son contenedores de almacenaje de agua (tanques, cisternas, tarros, barriles, cubos, etc.), sin

embargo, existen contenedores más pequeños como floreros, latas, botellas, neumáticos, carros chatarra, cubos, tinas, cazuelas, contenedores plásticos, muebles, juguetes, llantas, etc (Focks *et al.*, 2003). Cada vez más, *Ae. aegypti* está siendo encontrado en sitios no tradicionales o atípicos, como charcos sobre pisos de cemento, lonas plásticas, canales de lluvias, alcantarillado, tanques de salida de alcantarilla, pozos, fosas sépticas, y otros sitios subterráneos (Morrison *et al.*, 2004). En muchos casos estos sitios atípicos producen gran número de adultos de *Ae. aegypti* y a menudo plantean desafíos de control porque no son fáciles para eliminar o tratar con larvicidas. Estos sitios también indican que *Ae. aegypti* no siempre prefiere el agua limpia, los sitios de desarrollo larvario varían según las condiciones locales. Los huevos, que son sumamente resistentes al desecamiento, son puestos encima de la línea de agua e incuban sólo cuando los niveles del agua se elevan; es un mecanismo de supervivencia evidente que aumenta la probabilidad para la metamorfosis completa. La capacidad de los huevos para permanecer disecados durante meses representa un desafío particular para controlar. El desarrollo de larva a adulto es dependiente de la temperatura así como de los recursos alimenticios en el ambiente acuático (Focks *et al.*, 1993). Por ejemplo, la duración de etapas larvales puede extenderse de 7 a 9 días y el de pupa de 2 a 3 días en temperaturas de 25 ° C (Rodhain & Rosen, 1997). En *Ae. aegypti* la densidad larvaria es regulada principalmente por la competencia intraespecífica para el alimento (Southwood *et al.*, 1972); La mortalidad larval puede ser alta en condiciones naturales, mientras que la mortalidad de pupa que no se alimentan es baja. Cuando los recursos de alimentos son limitados o la temperatura es baja, el desarrollo puede reducir la marcha o detenerse hasta que las condiciones se presenten favorables nuevamente (McDonald *et al.*, 1977).

#### **4.5.2. Comportamiento adulto**

La asociación entre *Ae. aegypti* y las personas es fundamental ya que la transmisión se hace más eficiente para el Dengue. Es sumamente antropofílico (>95 %), las hembras y machos descansan dentro de casas donde se alimentan con frecuencia (varias veces durante un solo ciclo gonotrófico) y preferencialmente de las personas (Scott *et al.*, 2000). *Ae. aegypti* es principalmente un picador diurno, por lo general con dos picos de actividad, uno

a media mañana y el otro a última hora de la tarde (Rodhain & Rosen, 1997), pero el modelo se cambia por el comportamiento humano incluyendo la creciente disponibilidad de luz artificial y el trabajo fuera de casa durante el día, y no excluye alguna noche picando (Chadee & Martínez, 2000). Las hembras raras veces se dispersan más allá de 100m por alimento, ya que los sustratos para Oviposición están disponibles dentro de las viviendas donde ellos residen; el vuelo ampliado no es necesario y raras veces es descubierto (Harrington *et al.*, 2005). La fecundidad de una hembra *Ae. aegypti* dependerá del tamaño, la temperatura ambiente, y la disponibilidad de alimento además de los sitios de oviposición (Focks *et al.*, 1993). La disponibilidad de sitios de oviposición puede influir en el comportamiento desde que pone huevos, hasta causar la retención del mismo (Chadee *et al.*, 1997). Cuando los sitios de Oviposición son raros, hay aumentos de retención de los huevos y las hembras tienden a ponerlos en un determinado lugar; en contraste cuando los sitios son el objeto expuesto se lleva a cabo la distribución de huevos con múltiples sitios (Corbet & Chadee 1993; Colton *et al.*, 2003). También hay pruebas que indican que la indisponibilidad de sitios de oviposición estimula el aumento de la dispersión de las hembras (Reiter *et al.*, 1995). Aunque los adultos no vuelan grandes distancias, *Ae. aegypti* se transporta largas distancias vía coche, camión, barco, tren, y hasta avión parecen ser relativamente comunes (García-Franco *et al.*, 2002). Los sitios de descanso preferidos de adulto *Ae. aegypti* son lugares oscuros asociados a casas, sobre todo armarios, cuartos de baño, y muebles bajos.

Asumiendo que la mortalidad es independiente de la edad, la vida útil de las hembras, se estima, que es aproximadamente de 8 a 15 días y para machos de 3 a 6 días (Rodhain & Rosen, 1997), por lo general es expresada como la tasa de supervivencia de 24-hr. Las tasas de supervivencia diarias sólo pueden ser estimadas indirectamente y de forma diversa siendo encontradas del 55 al 90% (Harrinton et al 2005).

La supervivencia adulta, el tiempo de desarrollo de huevo, y la frecuencia de alimentación es dependiente de temperaturas (Focks *et al.*, 1993; Scott *et al.*, 2003). Aunque, la supervivencia adulta probablemente sea afectada por la exposición a patógenos, depredadores, humedad, precipitación, factores exógenos mal estudiados, estudios recientes

en campo (Harrington & Scott *et al.*, 2001) y laboratorio se manifestaron que la mortalidad adulta es dependiente de la edad.

#### **4.5.3. Capacidad del vector**

Poco se conoce sobre la magnitud de viremia necesaria para infectar a *Ae. aegypti* en la naturaleza (Rodhain & Rosen, 1997) y hay variabilidad claramente genética en la sensibilidad entre diferentes las poblaciones de orígenes geográficos. En general esperan que dosis virales más altas sean más infectivas. La resistencia relativa de *Ae. aegypti* a la infección con virus del dengue podría favorecer la propagación de cepas víricas que producen altas viremias y puede correlacionarse con severas manifestaciones clínicas (Rodhain & Rosen, 1997). La transmisión vertical del virus del dengue y virus de la fiebre amarilla ha sido demostrada en laboratorio. Las tasas de infección filiales (por ejemplo el porcentaje de progenie infectada) varían según la especie del mosquito y la cepa del virus, pero tienden a ser relativamente bajas, sobre todo para *Ae. aegypti*. Una tasa del 0.015% fue observada entre 5 cepas diferentes de *Ae. aegypti* en hembras F1 (Rosen *et al.*, 1988).

#### **4.5.4. Capacidad Vectorial**

Aunque sea menos susceptible a la infección el virus del dengue que otra especie, *Ae. aegypti* es un vector sumamente eficiente debido a que se alimenta de sangre, (Rodhain & Rosen, 1997) así como el comportamiento y la asociación cercana con poblaciones humanas. La alimentación sólo con sangre humana le confiere una ventaja de salud (Morrison *et al.*, 1999; Harrington *et al.*, 2001). Ha sido difícil mostrar las asociaciones entre la transmisión dengue y la densidad del vector así como las fluctuaciones estacionales en la supervivencia adulta o frecuencia alimenticia. Sin embargo, se ha mostrado que la transmisión de virus puede ocurrir en muy baja densidad en *Ae. aegypti* la cual está asociada con la transmisión del virus (Kuno, 1998) y espera que umbrales entomológicos para virus del dengue sean bajos (Focks *et al.*, 2000; Scott *et al.*, 2000); Canyon et al 1998. Un múltiple comportamiento de alimentación de *Ae. aegypti* aumenta las tasas de contacto con anfitriones infectados, y es la explicación de porque este mosquito es un vector tan excepcionalmente eficiente aún en bajas densidades (Scott *et al.*, 1993).

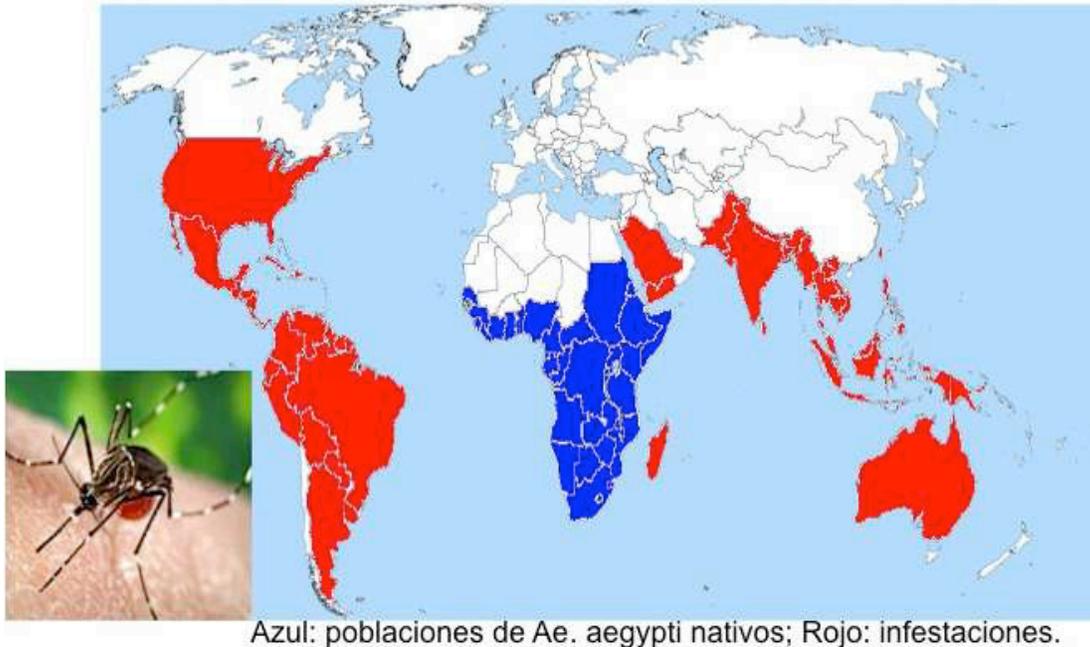
#### **4.5.5. Importancia de la detección de serotipos circulantes**

La detección y serotipificación del virus del Dengue en las poblaciones del mosquito vector en regiones donde la enfermedad es hiperendémica, puede servir como un sistema de alerta temprana que ayude a monitorear las tasas de infección de los diferentes serotipos dentro de las poblaciones vectoriales, para predecir epidemias tanto de FD, como de FHD a causa de la circulación concomitante de diferentes serotipos (Chung *et al.*, 2001; Philip & Tyagi, 2006). También puede complementar la vigilancia virológica durante los periodos inter e intraepidémicos (Sithiprasasna *et al.*, 2004). Este tipo de análisis permite posicionar el vector como el elemento primario y necesario en el ciclo de transmisión durante las evaluaciones epidemiológicas (Liotta *et al.*, 2005).

#### **4.6 Distribución geográfica**

Es de dominio universal el conocimiento de que el *Ae. aegypti* tiene una distribución muy amplia y estable entre los trópicos y zonas subtropicales; tiene, además, una preferencia doméstica en su ciclo de vida, por lo que su adaptabilidad es muy grande hacia los diferentes escenarios que el humano hace en sus viviendas; muy difundido en áreas con características urbanas, aunque también se encuentra en áreas rurales (Becker, 2012). Se distribuye en forma permanente entre los 35° de latitud norte y 35° de latitud sur pero puede extenderse hasta los 45° norte y hasta los 40° sur, donde coinciden con una isoterma de 10 °C en verano, la altitud promedio en donde se encuentra es por debajo de los 1,200 metros, aunque se ha registrado alturas de alrededor de los 2,400 metros sobre el nivel del mar en África. Sus condiciones mínimas de sobrevivencia y su resistencia a diferentes eventos adversos, como la desecación y la inanición, lo hace un mosquito de presencia muy común y continua, así como de elevadas densidades poblacionales durante las épocas lluviosas con temperatura y humedad estables (Nelson, 1986; Ibañez- Bernal 1986; Suarez & Nelson 1981; Christophers, 1960).

Mapa 3. Distribución mundial del *Aedes aegypti*, (Becker 2012)



Azul: poblaciones de *Ae. aegypti* nativos; Rojo: infestaciones.

El *Aedes aegypti* pertenece al Phylum *Artropoda*, Clase *Insecta*, Orden *Diptera*, Suborden *Nematocera*, Familia *Culicidae*, Tribu *Culicini*, Género *Aedes*, Subgénero *Stegomyia*, (Grupo “A”) Especie *aegypti* (Harwood 1979).

#### 4.7 Ciclo biológico

El *Aedes aegypti*, es predominantemente doméstico, prolifera en recipientes artificiales principalmente o en algunos naturales que se encuentran en las viviendas o en sus alrededores, únicamente las hembras son hematófagas, se alimentan de sangre humana o de los animales domésticos que detectan por estímulos visuales, movimientos, tamaño, olor, humedad, temperatura, concentración de CO<sub>2</sub>, entre otros. Esta sangre les es necesaria para desencadenar la maduración de sus óvulos y de esta forma puedan producir los huevos. Rara vez se encuentran a más de 100 metros de la vivienda humana (Martínez, 1987).

Los cambios morfológicos que tiene que experimentar *Ae. aegypti* a través de toda su vida son complejos, el hecho de tener que vivir en el agua cierto tiempo y luego desplazarse al ambiente aéreo requieren desde aparatos bucales diferentes (masticador como larva y picador chupador como adulto hembra) hasta formas de locomoción totalmente opuestas; movimientos natatorios de su cuerpo en el agua y presencia de un par

de alas para vuelo horizontal, vertical y a diferente velocidad. Las fases del ciclo de vida de *Ae. aegypti* son: huevo, larva (cuatro mudas con sus cuatro estadios respectivos), pupa y adulto diferenciado en sexos como hembra y macho (Chapman, 1982)

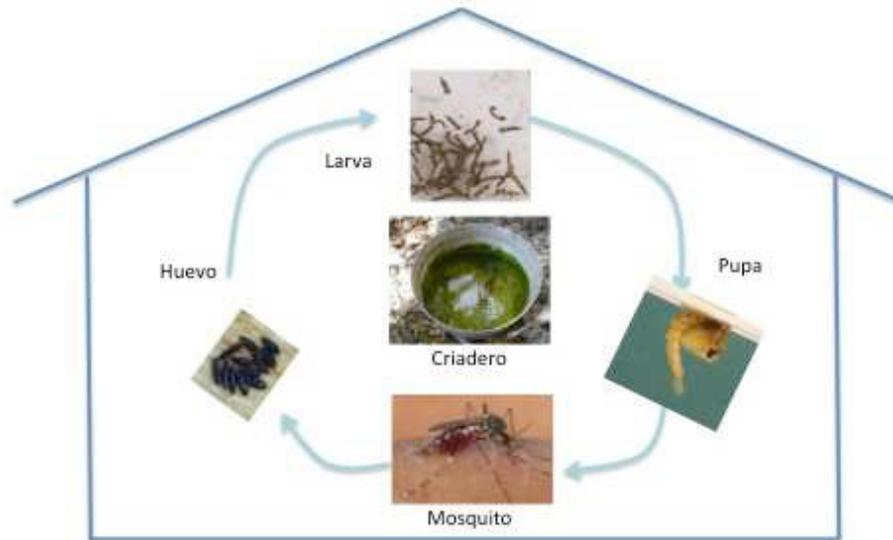


Figura 8. Ciclo de vida de un mosquito *Aedes aegypti*

#### 4.7.1. Huevos

Los huevos de *Ae. aegypti* miden aproximadamente un milímetro de longitud, son depositados uno a uno al ras del agua quedando adheridos a las paredes del recipiente. En el momento de la postura los huevos son blancos, cambian rápidamente a color negro al oxidarse la queratina. Completo el desarrollo embrionario, el embrión dentro del huevo es capaz de resistir largos períodos de desecación por meses o hasta por más de un año, al volver a tener contacto con el agua la acción bacteriana de la materia orgánica disminuye la tensión de oxígeno estimulando la eclosión en tan sólo alrededor de 15 minutos (Nelson, 1986).

Los mosquitos ponen sus huevecillos en recipientes artificiales domésticos con agua. Ponen entre 20 y 120 huevecillos casi en la línea del agua en donde se pegan. Esta etapa dura aproximadamente 48 horas. Se pueden secar y durar así hasta por más de 8 meses por lo cual pueden trasladarse a sitios alejados.

#### **4.7.2. Larva**

Las larvas de *Ae. aegypti* son acuáticas, y como en la mayoría de los insectos holometábolos, los estadios larvales son el período de crecimiento y desarrollo. Tienen cuatro estadios. Las larvas se alimentan prácticamente durante todo el día de cualquier materia orgánica acumulado en las paredes y en el fondo del recipiente, utilizan sus sedas bucales que tienen forma de abanico (Nelson, 1986).

La duración del desarrollo larval está en función de la temperatura, la disponibilidad de alimento y la densidad de larvas en el criadero. En condiciones óptimas, el período larval desde la eclosión hasta la pupación puede ser de cinco días, pero por lo regular ocurre de siete a catorce días. Las larvas de los machos se desarrollan más rápido que las hembras para garantizar la fecundación (Nelson, 1986).

#### **4.7.3. Pupa**

Las pupas no se alimentan. Su función es la metamorfosis del estadio larval al adulto. Las pupas de los mosquitos son diferentes a las de otros insectos holometábolos por presentar reacciones inmediatas a estímulos externos tales como vibraciones y cambios en la intensidad de la luz, desplazándose activamente por todo el criadero. En este estadio se desarrollan las alas en el tórax, tres pares de patas, un aparato bucal que será la probocis que le servirá para alimentarse, su abdomen y sus órganos internos.

El estadio de pupa dura aproximadamente dos o tres días, emergiendo alrededor del 88% de los adultos en cuestión de 48 horas (Méndez *et al.*, 1993).

#### **4.7.4. Adultos**

La función más importante del adulto de *Ae. aegypti* es la reproducción. En la mayoría de los insectos voladores, inclusive otras especies de mosquitos, el adulto también hace la labor de dispersión de la especie. Sin embargo, para *Ae. aegypti* el transporte pasivo de huevos y larvas en recipientes ha tenido mayor trascendencia en su distribución en la que el hombre ha participado en forma determinante en comparación con la dispersión activa propia de la especie (Nelson, 1986).

Al emerger, el mosquito adulto antes de 24 horas ambos sexos están listos para el apareamiento, alrededor del 58% de las hembras nulíparas son inseminadas antes de su primera alimentación sanguínea, un 17% durante y el 25% es inseminada entre la segunda alimentación y la primera oviposición; los machos rondan como voladores solitarios aunque es más común que lo hagan en grupos pequeños son atraídos por los mismos huéspedes vertebrados que las hembras. (Bates 1970; Kettle 1993)

Las hembras se alimentan de sangre de cualquier vertebrado, por sus hábitos domésticos muestran marcada predilección por la del hombre (Nelson, 1986). Los picos de alimentación ocurren principalmente durante el día registrando mayor actividad en la primera hora de haber amanecido y una hora antes del anochecer (Scott et al 1993).

Es común que después de cada alimentación sanguínea la hembra desarrolle un lote de huevos, la primera generación de óvulos requiere por lo menos dos alimentaciones sanguíneas para su maduración, aunque *Ae. aegypti* suele alimentarse más de una vez entre cada postura, es decir por alimentaciones múltiples, especialmente si es perturbada antes de estar completamente satisfecha con dos a tres miligramos de sangre, mientras se alimenta desecha gotas de un fluido claro (Nelson 1986;).

#### **4.7.5. Ciclo gonotrófico**

Por lo general, el intervalo de tiempo que transcurre entre la alimentación sanguínea y la postura (ciclo gonotrófico) es de 48-72 horas en los trópicos bajo condiciones óptimas de temperatura. Llega a ocurrir alimentación de nueva cuenta el mismo día en que se ponen los huevecillos. La mayoría de las posturas ocurre cerca del crepúsculo. La hembra grávida prefiere los recipientes oscuros o sombreados que contienen agua relativamente limpia, clara y transparente. Los huevos quedan adheridos a las paredes del recipiente en la zona húmeda justamente encima de la superficie del agua; la hembra suele distribuir los huevos de un mismo ciclo gonotrófico en varios recipientes (Nelson, 1986).

#### **4.8 Enfermedad.**

El dengue tiene un gradiente clínico importante como muchas de las enfermedades virales. Cerca del 70% de las infecciones cursan asintomáticas, lo cual si bien no producen

sintomatología, si producen una respuesta inmunológica lo cual si es muy relevante si llega a suceder una infección se puede desarrollar una forma severa. También se ha estimado que alrededor del 3% de las infecciones podrían corresponder a formas graves que requerirían hospitalización (Rothman, 2004; Bhatt, 2013).

Además de las dificultades para el diagnóstico también se tienen dificultades para poder establecer un diagnóstico adecuado, pues existen muchas enfermedades febriles que pueden suceder en el mismo lugar y fácilmente confundirse.

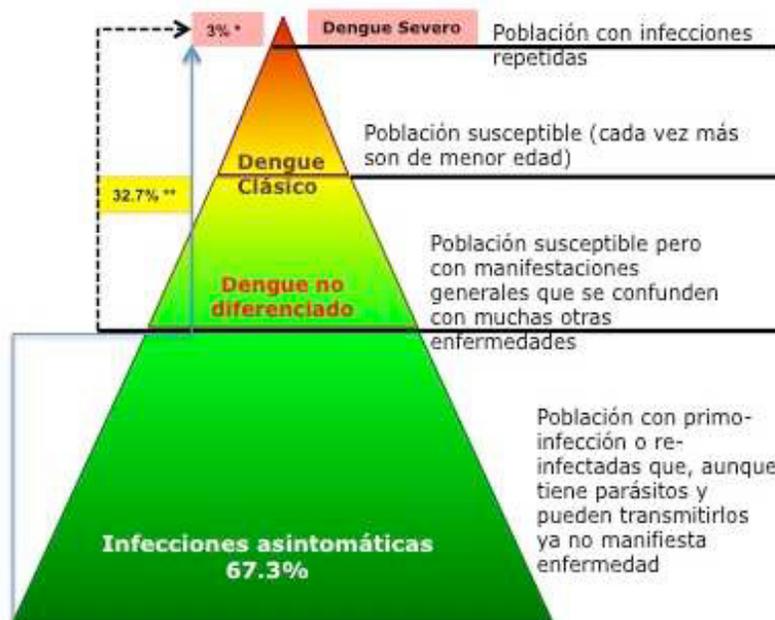


Figura 9. Iceberg clínico del dengue (Rothman 2004, Bhatt 2013; Méndez 2006)

También los cambios en la epidemiología del Dengue conducen a problemas con el uso de la actual clasificación de la OMS. Las infecciones sintomáticas por el virus del Dengue se agruparon en tres categorías: fiebre indiferenciada, fiebre por Dengue y fiebre hemorrágica por Dengue. Además, esta última se clasificó en cuatro grados, según su gravedad, en donde los grados III y IV corresponden al síndrome de choque por Dengue (OMS, 1997).



Figura 10. Clasificación de casos de dengue según la OMS (OMS 2009)

Ha habido muchos informes sobre dificultades en el uso de esta clasificación (Deen *et al.*, 2006) (Figura 6).

Las dificultades en la aplicación de los criterios clínicos para la fiebre hemorrágica por Dengue, junto con el aumento en los casos de Dengue clínicamente graves que no cumplen con los estrictos criterios para ese diagnóstico, llevaron a solicitar que se reconsiderara la clasificación. La OMS (2009) ha sugerido una nueva clasificación de los casos de dengue y su nivel de severidad.

#### 4.8.1. Fiebre por dengue (FD)

Es todo paciente con enfermedad febril aguda caracterizada por dos o más de las manifestaciones siguientes: cefalea generalmente frontal, dolor retro orbitario, mialgias, artralgia as, exantema y la presencia simultánea en la zona de otros casos confirmados de Dengue (OMS, 1997). Para la nueva clasificación sugerida por la OMS se ha definido como caso probable de Dengue no grave o fiebre por dengue: Toda persona de cualquier edad que resida o que proceda, en los 14 días previos al inicio de signos y síntomas, de una región donde exista transmisión de la enfermedad y que presente fiebre y dos o más de los siguientes signos y síntomas: Náusea, vómitos, exantema, Mialgias, artralgia, Cefalea, dolor retro-ocular, Petequias o prueba del torniquete positiva, Leucopenia. En menores de 5 años, el único signo a considerar puede ser la fiebre (OMS 2010).

#### 4.8.2. Fiebre hemorrágica por dengue (FHD)

Incluye todos los siguientes criterios: fiebre o antecedente de fiebre, presencia de hemorragia evidenciada por la prueba del torniquete positiva, petequias, equimosis, púrpura y/o sangrado de mucosas, del tracto gastrointestinal, sitios de inyecciones u otras, acompañado de trombocitopenia igual o menor a  $100,000/\text{mm}^3$ , señales de extravasación de plasma y de incremento en la permeabilidad vascular (derrame pleural, ascitis). Así como la presencia de hemoconcentración manifestada por un incremento en el hematocrito mayor de 20% (OMS, 1997). De acuerdo a la última revisión de la OMS en la cual se denomina dengue severo o grave a todo caso probable de Dengue que presenta uno o más de los siguientes hallazgos Choque debido a extravasación grave de plasma evidenciado por: taquicardia, extremidades frías y llenado capilar igual o mayor a tres segundos, pulso débil o indetectable, presión diferencial convergente  $\leq 20$  mm hipotensión arterial en fase tardía, acumulación de líquidos que conlleve a insuficiencia respiratoria. • Sangrado grave, según la evaluación del médico tratante (ejemplos: hematemesis, melena, metrorragia voluminosa, sangrado del sistema nervioso central); • Compromiso grave de órganos tales como: daño hepático importante (AST o ALT $>1000$ ), afección renal, sistema nervioso central (alteración de la conciencia), corazón (miocarditis) u otros órganos (OMS 2010).

#### **4.8.3. Síndrome de Shock por Dengue (SSD)**

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

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

## 4.9. Epidemiología

### 4.9.1. Distribución geográfica

Todas las áreas que se encuentran entre los trópicos y algunas regiones neotropicales están en riesgo de sufrir brotes de dengue. Más de 100 países han notificado casos de dengue, principalmente en el sur asiático y Las Américas.

La transmisión del dengue está regulada por la temperatura, de ahí que sean las zonas que presentan temperaturas cálidas y húmedas y otras con periodos de calor simultáneo con lluvias, se vean afectadas. Cabe hacer la aclaración de que el cambio climático está afectando esta distribución del dengue. Resulta que cada vez es más común los registros de infestaciones de los vectores *Ae. aegypti* y *Ae. albopictus* a altitudes mayores a los 1800 metros sobre el nivel del mar, que era el límite que se definía anteriormente, así como brotes.

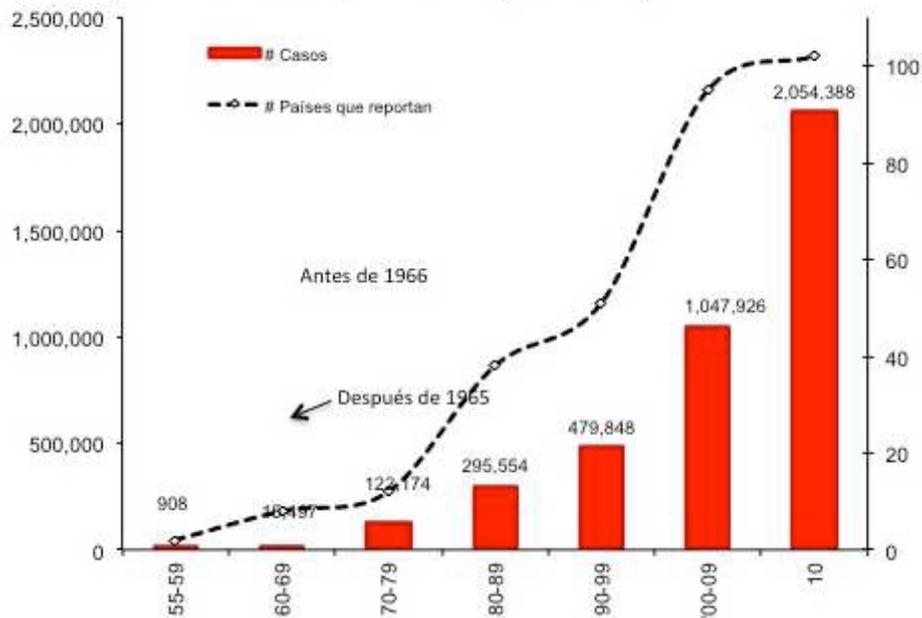


### 4.9.2. Nivel Mundial

el dengue va en ascenso, pareciera que pese a todos los esfuerzos y recursos que se destinan para su control, son inútiles. Desde que se tiene registro entre los países del sur de Asia en 1955 hasta 2010, el dengue subió de menos de mil casos por año a más de dos millones por año según datos de la OMS.

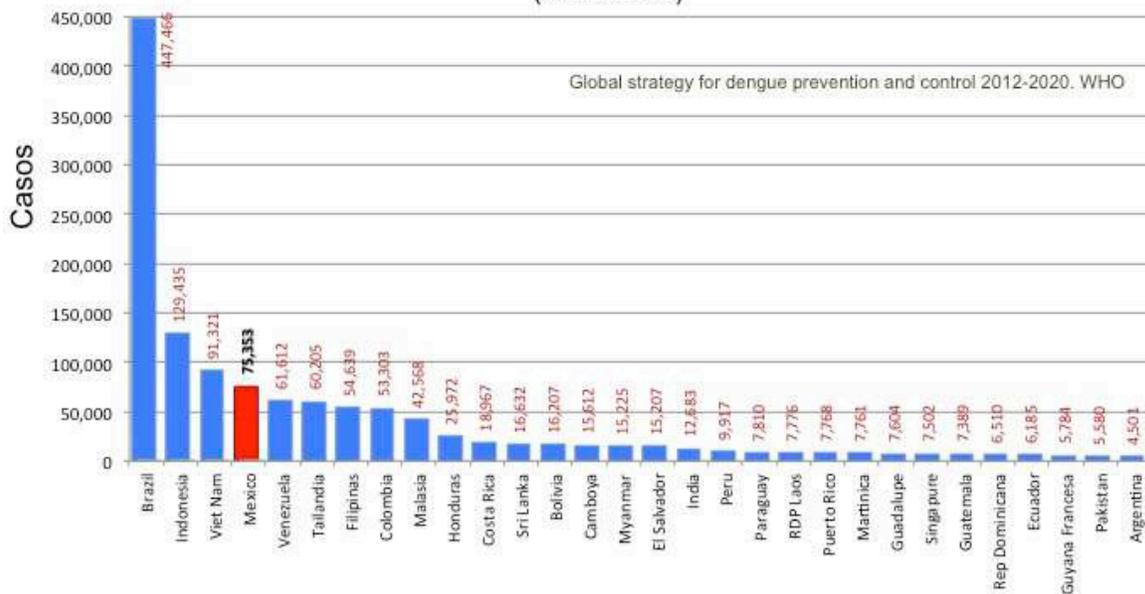
Paralelamente a este incremento, la distribución de los cuatro serotipos del dengue en todas las regiones endémicas han facilitado el incremento concomitante de FHD y su letalidad. Mientras que los brotes por FHD iniciaron en Filipinas y se dispersaron en esa región incrementándose cada año, en Las Américas en primer brote de FHD se conoció en Cuba en 1981 y posteriormente en Venezuela en 1989, para luego dispersarse por todo el continente. Puerto Rico notificaba casos aislados en ese tiempo.

Gráfica 2. Promedio anual de casos de dengue notificados a la OMS por los países endémicos, 1955-2010 (WHO 2012)



Tan solo entre los años 2004 y 2010 los países que más dengue notificaron a la OMS fueron Brasil con casi 450 mil casos, Indonesia y Viet Nam entre los 90 mil y 130 mil casos, pero es de llamar la atención de que México ocupó el cuarto lugar en incidencia notificada con 75,353 casos acumulados en ese periodo. También llama la atención que la mitad de los países más afectados corresponden a Las Américas (Brasil, México, Venezuela, Colombia, Honduras, Costa Rica, Bolivia y El Salvador).

Gráfica 3. Incidencia acumulada de los países más afectados en el mundo 2004-2010 (WHO 2012)



#### 4.9.3. México

En México se tienen registro de casos de dengue antes de la década de los 1960, desapareciendo la incidencia como resultado de la erradicación del *Ae. aegypti* dentro de los esfuerzos de eliminar la fiebre amarilla urbana, iniciativa coordinada por la Organización Panamericana de la Salud. Con esta iniciativa además de México se logró la erradicación del vector de la fiebre amarilla y del dengue en 18 países más de la región de Las Américas (Torres Muñoz 1966). Por el interés que significa, Estados Unidos de América no participó en la erradicación del *Ae. aegypti*, lo que siempre fue una amenaza para el país.

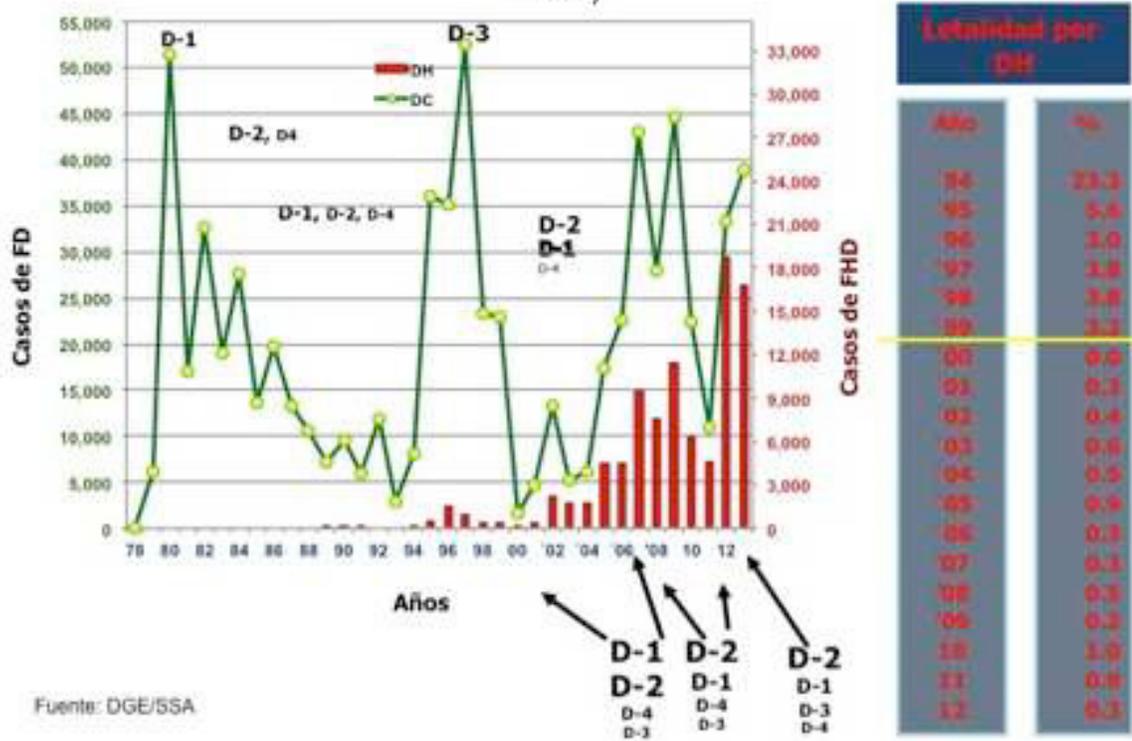
Poco tiempo duró la eliminación del mosquito ya que al año de haberse certificado en Guatemala y Brasil reapareció; aunque no se tiene una fecha precisa de la reaparición se piensa que a mediados de la década de 1970 México se reinfestó (Schliessman 1974). El dengue reaparece a mediados de la década de 1960 y en México en 1978 se presentan dos brotes simultáneas en la región de Tapachula, Chiapas y de Chetumal, Quintana Roo (DGE 1960-1980).

A partir de 1978 reaparecen los brotes por dengue en México que iniciaron en la zona fronteriza con Centroamérica y se fue dispersando por todo el país y para 1989 todos los estados ya habían notificado casos de FD.

El primer brote alcanzó un registro de más de 50 mil casos todos producidos por el DENV-1. En 1982 se detecta el DENV-2 y algunos aislamientos del DENV-4. La incidencia fue declinando posiblemente por un mal diagnóstico. Aparentemente se alternaron los tres serotipos mencionados hasta que en 1995 se identifican los primeros casos de dengue producidos por el DENV-3 alcanzando más de 50 mil casos de FD; este último serotipo no se había detectado en el país previamente.

**FHD.** Antes de 1994 se notificaron varios casos de FHD. En Yucatán se notificaron 9 casos de los cuales fallecieron 4, en los que se pudo identificar los serotipos DENV-1 y DENV-4; Guerrero notificó 5 casos en 1990; En San Luis Potosí se conocieron 2 casos en 1990; entre 1990 y 1993 se notificaron en Oaxaca dos casos, dos en Sinaloa, 2 en Chiapas, 2 en Morelos, 1 en Campeche y 1 en el Distrito Federal (posiblemente importado). En mayo de 1994, se detectó el primer caso de FHD de un brote que cerraría el año con 30 casos; no obstante, es posible que hubieran sucedido un número mucho mayor debido a la falta de reconocimiento de la enfermedad por los médicos. Este primer brote se relacionó con la aparición del DENV-3. Como consecuencia de este brote se organizó un Programa Emergente donde primero se fortalecieron los Laboratorios Estatales de Salud Pública para que realizaran el diagnóstico serológico de los casos y segundo se iniciaron acciones de control del vector en forma enérgica. Cabe señalar que el Programa de Control del Dengue que contó con financiamiento propio fue en 1997, debido a que antes dependía del presupuesto del Programa de Control del Paludismo.

Gráfica 4. Dengue en México, 1978-2014 (Méndez 2006, DGE SSA)



Posteriormente se presentaron brotes de FHD producidos por la identificación simultanea de varios serotipos principalmente DENV-1 y DENV-2. La tendencia de la incidencia de FHD va en ascenso presentando exacerbcaciones en algunos años. La letalidad por FHD en 1994 fue de 23.3 por cada cien casos, en 1995 disminuyó a 5.6 y entre 1996 y 1999 se natuvo alrededor de 3 por cada cien casos de FHD. A partir del año 2000 la letalidad baja y se mantiene alrededor del 1 por ciento, debido a un programa de capacitación para el diagnóstico y manejo de los casos de FHD.

#### 4.9.4. Seroepidemiología en México

La seroepidemiología debía ser el mejor instrumento para la vigilancia epidemiológica; no obstante en México ha sido poco utilizada y publicada.

Los primeros estudios realizados de seroencuestas epidemiológicas fue en 1986 dentro de la Encuesta Nacional de Salud, y fue para establecer áreas de riesgo principalmente. Se encuestaron 3,408 viviendas de 70 localidades, con población menor de 50,000 habitantes y se obtuvieron muestras de sangre en población menor de 25 años. Como

resultado se observó que la prevalencia de anticuerpos contra dengue fue del 32.97% en el total de la muestra; los estados más afectados fueron Oaxaca 62.8%, Michoacán 61.5%, Guerrero 51.3%, Yucatán 50.4%, Chiapas 50.2% y Veracruz con 47.5%. Es importante recalcar que esta prevalencia fue en localidades menores a 50,000 habitantes donde el dengue no afecta igual que en las grandes urbes (Méndez, 1994).

En 1996 un primer estudio realizado en la Península de Yucatán mostró que en Quintana Roo el 78.9% de la población tenía anticuerpos IgG de huella inmunológica contra dengue de una muestra estatal estadísticamente significativa; en Campeche el 69.9% tuvieron anticuerpos y Yucatán el 59.9% (Gómez-Carro y Méndez Galván, datos no publicados). Diez años después, en 2006, se realizó una segunda encuesta solo en el estado de Yucatán y se encontró que la población con anticuerpos contra dengue de infecciones antiguas se incremento hasta 82.6% (Gómez-Carro y Méndez-Galván datos no publicados); de esta información se conoció que los <5 años fue el grupo de edad menos afectado, pero conforme la edad avanzó fue creciendo la seroprevalencia y en los >64 años prácticamente todos tuvieron seropositividad.

Se han realizado otros estudios principalmente en la frontera norte de México, donde en han encontraron prevalencias 48% en Nuevo Laredo, Tamaulipas (Reiter et al, 2003); en Matamoros, Tamaulipas, el 40% de prevalencia (Brunkard et al 2007); en otra encuesta en Matamoros se encontró una prevalencia de 32% (Ramos et al, 1008); en el estado de Morelos fue 76.6% y conforme la edad se incrementa también la seropositividad y de 30 y + años todos los grupos de edad estuvieron por arriba del 90% (Amaya-Larios et al 2014)

Ante esta información se puede concluir que en México y también en todos los países con dengue, existe un subregistro importante del dengue. Sabemos que alrededor del 70% de las infecciones cursan asintomáticas y solo un 30% manifiestan alguna sintomatología desde leve hasta severa.

Esto quiere decir que la capacidad de transmisión del mosquito es muy elevada.

#### **4.9.5. Transmisión**

La infección por mosquitos comienza cuando las hembras ingieren sangre con el virus del dengue de un huésped humano. Después de sobrevivir a un período de incubación extrínseco de 7-14 días, los mosquitos se vuelven infecciosos y pueden transmitir el virus a

través de la picadura a otra persona susceptible (Watts et al., 1987). La duración del periodo de incubación extrínseca en los mosquitos esta directamente regulada por la temperatura. El periodo de incubación del virus en humanos puede durar entre 3-15 días (típicamente 4-7 días). La viremia puede preceder a la fiebre, dura ~ 5 días y disminuye con la pérdida de la capacidad de detectar virus en la sangre (Focks et al., 1995, Waterman SH, Gubler D, 1989, Vaughn et al, 2000). Una característica particular es que *Ae. aegypti* puede interrumpir su alimentación y reiniciar picando a la misma persona u otra. Este comportamiento incrementa el riesgo de transmisión del virus del Dengue debido a que un mosquito infectado puede picar a más de dos personas para completar su alimentación. (Scott *et al.*, 1993).

Los mosquitos hembra se espantan facilmente, interrumpiendo el proceso de alimentación al menor movimiento, solo para regresar a la misma persona o a una persona diferente para continuar alimentándose momentos más tarde. Debido a este comportamiento, las hembras de *Ae. aegypti* a menudo se alimentan de varias personas dentro de un ciclo gonotrófico y, si estan infectadas con DENV, pueden transmitir a múltiples personas en poco tiempo (Chadee 2000; Platt, 1997; Canyon 1998; Putman, 1995; Scott, 1993; Reiter 2007). No es raro ver a varios miembros de la misma casa presenten sintomatología de dengue dentro de las siguientes 24 a 36 horas, lo que sugiere que todos ellos fueron infectados por el mismo mosquito infectado. Es este comportamiento el que hace que el *Ae. aegypti* sea un vector epidémico muy eficiente.

Después de que una persona es picada por un mosquito infectado, el virus tiene un período de incubación de 3 a 14 días, después de lo cual la persona puede experimentar fiebre de inicio agudo acompañada de una variedad de signos y síntomas inespecíficos. (Rigau-Perez et al 1998). Durante este período febril agudo, que puede ser tan corto como 2 días y hasta 10 días, los virus del dengue pueden circular en la sangre periférica (Gubler et al 1981).

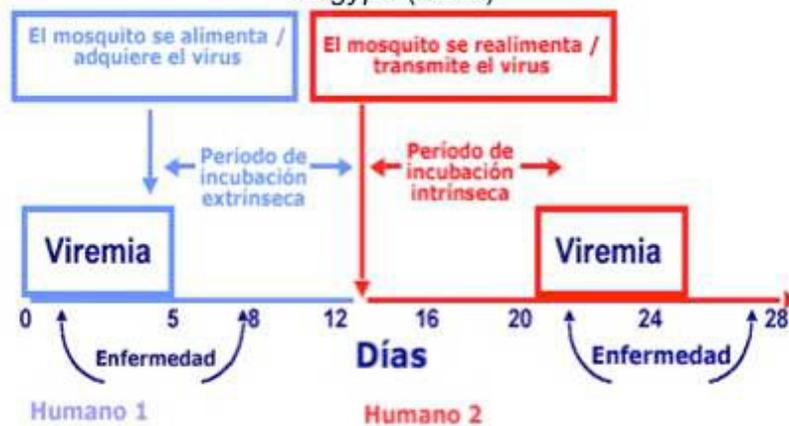
#### **4.9.6. Periodo extrínseco de incubación**

Es el intervalo de tiempo entre la infección del vector y la transmisión del virus por el mismo, cuando éste todavía está afuera del hospedero. Se ha reportado que el periodo

extrínseco de incubación (PEI) está en el rango entre d 7-14 días (Siler *et al.*, 1926; Black, 2001; Gubler, 1998).

Inmediatamente después que un mosquito hembra toma una alimentación de sangre de una persona infectada con dengue, se infecta con el virus en las células epiteliales del intestino. Alrededor de 8-10 días después, el virus se esparce a otros tejidos incluyendo las glándulas salivales y subsecuentemente se libera a la saliva. El virus parece que no tienen un efecto perjudicial sobre el mosquito, el cual permanece infectado de por vida (Gubler, 1998)

Figura 11. Transmisión del virus del dengue por el *Ae. aegypti* (CDC)



#### 4.9.7. Periodo intrínseco de incubación

Es el tiempo desde la infección con el virus hasta el inicio de los síntomas en el hospedero humano. El periodo intrínseco de incubación (PII) promedia entre los 4.5 y 7 días, con un pequeño número de casos que exceden los 10 días, y la viremia puede sobrevenir de 6-18 horas antes del inicio de la fiebre. La viremia sintomática aparece a los 4-5 días, pero puede extenderse hasta los 12 días (Siler *et al.*, 1926).

#### 4.9.8. Factores involucrados en las epidemias de Dengue

##### 4.9.8.1. Factores relacionados al mosquito

**Densidad de mosquitos requeridos para la transmisión.** La densidad mínima de *Ae. aegypti* que permite la transmisión del virus se ha debatido por mucho tiempo y aún no hay un dato en específico. Por ejemplo, durante un brote de fiebre amarilla en Quito, el Índice de Casa (IC) fue de 5 (Smith, 1951). Sin embargo, en Singapur, donde la densidad del vector se ha mantenido con un Índice de Casa de menos de 1 por muchos años, las infecciones por dengue ocurrieron sobre un periodo largo de tiempo (Chan, 1985).

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

#### 4.9.8.2. Factores ambientales

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

**Temperatura.** Temperaturas cálidas y alta humedad contribuyen a un incremento en la sobrevivencia de adultos. Además, acortan el ciclo gonotrófico y el periodo extrínseco de incubación (Yasuno & Tonn, 1970). También inciden en el comportamiento de densidades a través del año (Winch *et al* 1992)

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

**Variación climática global y el calentamiento global.** Los datos que apoyan que una influencia en variaciones climáticas interanuales, como El Niño, y del calentamiento

global en la transmisión del dengue no son convincentes. La transmisión del dengue está muy relacionada con la pobreza urbana, la falta de agua entubada universal y de aire acondicionado (Halstead, 2008b)

#### **4.9.8.3. Factores relacionados al humano**

El comportamiento humano sin duda es decisivo en la epidemiología del dengue. Desde la aparición del vector en diferentes partes del mundo quizá en 1500 con los viajes trasatlánticos, la movilización de los virus hacia lugares donde no había dengue hasta la forma de vivir de la población considerando sus niveles cultural, educativo, económico y social. El *Ae. aegypti* se ha acoplado muy bien a las formas de vivir en diferentes lugares del mundo, guardando siempre su dominio domiciliar.

Sin duda el fracaso de las medidas de control se debe en mucho al comportamiento de gente, ya que le brinda al mosquito un habitat adecuado para alimentarse, reproducirse y protegerse. El incremento de recipientes desechables ha influido mucho en el crecimiento de poblaciones así como en parte en su dispersión.

Las vías de comunicación que con el tiempo han mejorado las formas y los tiempos de traslado en forma permanente. Las necesidades de migrar en búsqueda de mejores formas de vida también es determinante en la dispersión de la enfermedad y del vector.

***Número básico de reproducción.*** El número básico de reproducción,  $R_0$ , es el número de infecciones secundarias que resultan de un único humano infectado. A mayor número básico de reproducción, mayor es la explosión de la transmisión. Las enfermedades con altos números están caracterizadas con umbrales bajos de inmunidad de grupo (Fine, 1993). Los números básicos de reproducción estimados para dengue están en el rango de 1.33 y 11.6. Las grandes variaciones en este valor se deben a que muchas de estas mediciones sufren de limitaciones en los datos o metodologías epidemiológicas, entomológicas o serológicas (Halstead, 2008b).

***Título de la viremia.*** Un punto crucial para la transmisión exitosa es la cantidad de virus en la sangre. Sin embargo, el umbral virémico necesario para la transmisión del virus

dengue es desconocido. La duración de la viremia puede estar en función de la dosis viral administrada por los mosquitos infectados (Nishura & Halstead, 2007).

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

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

**Re-infección.** La observación epidemiológica fundamental relacionada al FHD y SSD es que ocurren regularmente en localidades donde dos o más serotipos del dengue están simultáneamente, o en epidemias secuenciales. En estas localidades, FHD y SSD ocurren en dos grupos inmunológicos: a) en individuos de un año o más quienes han sido infectados con dos o más serotipos de dengue diferentes en intervalos de al menos un año hasta 20 años, y b) en áreas hiperendémicas, con individuos menores de un año quienes adquirieron anticuerpos pasivamente (leche materna de madres que ya habían sido infectadas) y quienes son infectados con el virus del dengue por primera vez, siempre y cuando los serotipos que hayan infectado, tanto a la madre como al bebé, hayan sido diferentes (Halstead, 2008a). Las segundas infecciones con dengue se han asociado con grandes y brotes de FHD/SSD (Kouri *et al.*, 1986).

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

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

**Factores relacionados con el ambiente y la sociedad.** El espacio y el tiempo urbano también son dos dimensiones importantes para describir la dinámica de un brote de dengue.

Por ejemplo en un estudio realizado en el estado de Veracruz se concluyó que las localidades repetidoras de dengue fueron grandes centros urbanos, con baja marginación y extensa dotación de servicios públicos. El promedio de casos de dengue reportados en las localidades dependió del tamaño de la misma y del número de años que reportaron dengue durante el periodo (Escobar & Gómez 2003). el número medio de personas por local y el porcentaje medio de personas desempleadas, una variable altamente correlacionada con el modo de vida de las personas. La aglomeración de la población y el aire acondicionado esta relacionado con la transmisión del dengue (Reiter *et al*, 2003).

Se ha culpado a una variedad de factores: el crecimiento explosivo de las zonas urbanas, la globalización, los recursos gubernamentales limitados, la gestión deficiente, la capacitación inadecuada del personal de campo, la dependencia excesiva de insecticidas, la aplicación incorrecta de insecticidas, la resistencia a los insecticidas, énfasis excesivo en la intervención del gobierno y educación insuficiente del público (Gubler, 1998, 2002, 2002, 2004, 2005, 2006, 2011; Morrison *et al.*, 2008; OMS / TDR, 2009).

#### **4.9.8.4. Factores relacionados al virus**

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

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

la neutralización parcial y la reducción de la enfermedad por los anticuerpos anti-DENV-1 (Kochel *et al.*, 2002).

#### **4.9.9. Sistemas de vigilancia**

##### **4.9.9.1. Vigilancia epidemiológica**

El objetivo principal de la vigilancia epidemiológica en la salud pública es conocer oportunamente un problema de salud para poder prevenirlo y controlarlo según el caso. Otros objetivos para la vigilancia incluye definir la gravedad de la enfermedad, determinar la relación costo-efectividad de los programas de prevención de salud pública y estimar la carga de morbilidad en la comunidad. El programa de vigilancia ideal para el dengue debería ser, por lo tanto, monitorear los casos de dengue con precisión y detectar epidemias inminentes para desencadenar medidas preventivas o de control de emergencia.

La vigilancia puede ser pasiva o activa. La pasiva se fundamenta en la detección de casos clínicos que se presentan a consulta en los sistemas oficiales de salud; la vigilancia activa es mediante encuestas directas sobre la población buscando casos febriles para detectar tempranamente los brotes; con regularidad se toman muestras de sangre de una proporción de los casos probables y son sometidas a un análisis serológico (determinación de anticuerpos *IgM* e *IgG*) o molecular (*RT-PCR*) y a un estudio epidemiológico en el que se localiza la vivienda del enfermo; también se realizan encuestas para detectar prevalencia de anticuerpos de infecciones viejas para conocer cuanta población ha sido infectada por los virus del dengue (Chairulfatah *et al.*, 2001; Kurukumbi *et al.*, 2001, CDC 1988; Gratz, 1991). En la detección de casos de dengue existen varias dificultades, se conoce que alrededor del 70% de las infecciones son asintomáticas; muchos de los casos clínicos de FD se pueden confundir fácilmente con otras enfermedades febriles; alrededor del 3% de los casos clínicos pueden evolucionar a FHD pero también pueden confundirse con otras enfermedades infecciosas (Hamond *et al.*, 2015; Harris 2000). El subregistro y el sobregistro son problemas comunes (Beatty *et al.* 2010; Gubler, 2002; Tapia, *et al.* 2012; Undurraga, 2013; Halstead, 2007; Wilder-Smith, 2005).

##### **4.9.9.2. Vigilancia entomológica**

El *Ae. aegypti*, transmite el virus con notable eficiencia y sus umbrales entomológicos son especialmente bajos. Evaluar el riesgo de infección humana basado en índices de inmaduros ha resultado difícil y de poca utilidad para estimar los riesgos de transmisión. No obstante, ha sido el de mayor uso por los programas de vigilancia y control del dengue.

La escala espacial más apropiada para evaluar el riesgo entomológico es el hogar. La escala para medir el riesgo de transmisión del DENV aún no se ha determinado, pero es claramente más grande que el hogar y es probable que exceda varias manzanas de la ciudad (Scott & Morrison, 2010).

La vigilancia entomológica se emplea para determinar los cambios en la distribución geográfica del vector, para obtener mediciones relativas a la población de vectores tanto adultas como acuáticas a lo largo del tiempo y para facilitar las decisiones apropiadas y oportunas en lo referente a intervenciones. Los sistemas de vigilancia para prevenir epidemias de Dengue se han apoyado en los índices larvarios, obtenidos a partir de la inspección de contenedores con agua existentes dentro y alrededor de las casas inspeccionadas. Habitualmente se emplean los siguientes índices para estimar los niveles de infestación por *Ae. aegypti* (PAHO, 1994):

- INDICE DE CASA:  $(\text{Casas infestadas} / \text{Casas inspeccionadas}) \times 100$
- ÍNDICE DE RECIPIENTES: % de depósitos con agua infestados por larvas, pupas o ambas:  $(\text{Recipientes positivos} / \text{Recipientes inspeccionados}) \times 100$
- ÍNDICE DE BRETEAU: número de recipientes positivos por 100 casas inspeccionadas

Se han utilizado también vigilancia con el índice de pupas, por medio de ovitrampas y recolección de imagos, aunque con menos frecuencia.

#### **4.9.9.3. Prevención**

Se ha licenciado la primera vacuna pero solo esta aprobada para prevenir formas severas (Capedini). Ante la falta de medicamentos efectivos y de vacunas probadas en campo, el control del Dengue se centra en su prevención, la cual se basa en la eliminación del vector. Hasta ahora los intentos para eliminar al mosquito de *Aedes* se han apoyado

exclusivamente en la aplicación de productos químicos, tanto larvicidas como adulticidas (Gratz, 1991).

#### **4.9.9.4. Mosquitos *Ae. aegypti* infectados en campo: Estudios previos.**

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

##### **4.9.9.4.1. Asia**

Chung *et al.*, (2001) encontraron que el 1.33% de los machos colectados en Singapur desde septiembre de 1997 hasta agosto de 1998, estaban infectados con Dengue, siendo el primer estudio que demostró la transmisión vertical en el ambiente natural.

Chung y Pang (2002), colectaron 781 hembras desde 1997 hasta el 2000 en Singapur, y se encontró que el 6.91% fue positivo para Dengue, principalmente DENV-1. Además, se correlacionó la tasa mínima de infección de mosquitos con el número de casos de DC/DHF en ese país, en la cual la tasa mínima de infección descendió de 12.45 por 1000 mosquitos en 1997, a 3.85 por 1000 mosquitos en 1999; al igual que los casos de DC/DHF, de 130.1 por cada 100,000 habitantes en 1997 a 35.4 por cada 100,000 habitantes en 1999.

En el sureste de Taiwán, Chen *et al.*, (2010) colectaron 43,133 mosquitos hembra entre el periodo 2004-2007 y los agruparon en 7628 lotes, de los cuales fueron positivos solamente el 0.2%. La tasa de infección calculada por la Estimación de Máxima Probabilidad fue de 0.970 por 1000 mosquitos (Intervalo de confianza, 95% [IC]= 0.53–1.65). Los cuatro serotipos de DENV fueron detectados con un 8.3% para DENV-4 en 2004, 16.7% para DENV-2 y 66.7% para DENV-3 en 2005-2006 y un 8.3% para DENV-1 en 2007. La transmisión en esta Región es única, porque recibe una constante importación de diferentes serotipos de DENV de los países del sureste asiático vecinos.

##### **4.9.9.4.2. América**

###### **4.9.9.4.2.1 México.**

El primer estudio de este tipo realizado en México fue hecho por García-Rejón *et al.*, (2008) en Yucatán, México, donde se procesaron 336 lotes de hembras (total 1938), colectadas en las viviendas de pacientes (casos de Dengue confirmados por el Laboratorio de Arbovirología, UADY) que habían mostrado síntomas dentro de un rango de 1-4 semanas, resultando positivos 34 lotes (10.1%) para DENV por RT-PCR, predominando el serotipo DENV-1, sobre DENV-2 y DENV-3. La tasa mínima de infección fue de 1.8%.

Mora-Covarrubias *et al.*, (2010) hicieron el primer reporte de la presencia de mosquitos hembra infectados con Dengue en Ciudad Juárez, Chihuahua, México. Se capturaron 122 mosquitos y se agruparon en 42 lotes, de los cuales siete fueron positivos para DENV-2, diez para DENV-3 y siete para ambos serotipos.

#### **4.9.9.4.2.2. Sudamérica**

El primer estudio realizado en esta Región fue en Colombia por Romero *et al.*, (1998), donde colectaron 2065 hembras durante seis meses, de los cuales tres fueron positivos para DENV-1 y 21 para DENV-2. La tasa mínima de infección contando ambos serotipos fue de 1.1%. Estos resultados fueron consistentes a los serotipos detectados en pacientes que habían padecido Dengue en la región de estudio.

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

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

Urdaneta *et al.*, (2005) condujeron un estudio de Noviembre del 2000 a Diciembre de 2001 en estado de Aragua, Venezuela, colectaron 1,632 mosquitos y se agruparon en 296 lotes; de esos, 154 lotes (469 mosquitos) fueron colectados en casas de personas con diagnóstico clínico de Dengue, y los otros 142 lotes (1,163 mosquitos) de residencias

adyacentes. De las primeras casas, ocho lotes (5.2%) fueron positivos para DENV-1 (0.7%), DENV-3 (3.2%) y DENV-4 (1.3%). De las residencias adyacentes, 18 lotes (12.7%) fueron positivos para DENV-3 (12%) y DENV-4 (0.7%). De 26 lotes positivos a Dengue, 22 de ellos fueron positivos a DENV-3 (84.6%). El serotipo más prevalente en el 2001 en la epidemia de Dengue también fue DENV-3. La tasa mínima de infección fue de 17 por 1000 mosquitos en las casas con pacientes diagnosticados con Dengue, y de 15 por 1000 mosquitos en las residencias adyacentes.

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

#### **4.9.9.5. Sistemas de información geográfica (GIS) como herramientas en la vigilancia del dengue y para el control del vector.**

Los primeros estudios fueron hechos en Tailandia por Sithiprasasna *et al.*, (1997, 2004), en la que se utilizaron los GIS para el estudio de la distribución espacial de la fiebre por Dengue. Se utilizó el sistema de posicionamiento global (GPS) para referenciar y mapear las localidades involucradas en los estudios epidemiológicos de dengue. En el GIS, a los mapas creados se les superpuso el nombre de la localidad, número de casa, datos demográficos de los ocupantes de las casas, las poblaciones de *Ae. aegypti*, los criaderos positivos presentes y los datos seroepidemiológicos de los ocupantes de las casas. Estas bases de datos demostraron ser herramientas poderosas para monitorear el estatus de los esfuerzos de control de los criaderos de *Ae. aegypti* y evaluar el impacto de su control en la transmisión de dengue y dengue hemorrágico.

Lozano-Fuentes *et al.*, (2008) utilizaron el programa de Google Earth® para obtener imágenes de satélite y con las herramientas simples del software, generaron información de la infraestructura de la ciudad para desplegar los datos de la enfermedad en un Sistema de Soporte a Decisión del Dengue (DDSS en inglés). La combinación de Google Earth® demostró que tiene un tremendo potencial para fortalecer la capacidad de salud pública en general y facilitar la labor de los sistemas de soporte a decisiones para prevenir y controlar las enfermedades transmitidas por vectores en regiones de pobreza.

Chang *et al.*, (2009) desarrollaron un sistema de vigilancia utilizando Google Earth® y tecnologías de mapeo GIS (ArcGIS 9) en Nicaragua. Obteniendo imágenes visuales de la localización de los casos de dengue, infestación larval y de los sitios potenciales en el desarrollo larval, que fueron utilizadas por especialistas del control de dengue para priorizar las intervenciones de control específicas a ciertos vecindarios. Este programa de vigilancia de dengue logró priorizar las estrategias de control en las áreas de más alto riesgo para eliminar la fuente más probable del mosquito vector. Este programa se adaptó bajo recursos limitados y puede ser implementado en muchos países en vías de desarrollo a un bajo costo.

El objetivo del presente estudio es detectar la circulación de los diferentes serotipos del virus de Dengue en poblaciones del mosquito vector *Ae. aegypti* como un sistema complementario a la vigilancia actual en la ciudad de Cancún, Quintana Roo, México. Además de estimar las densidades poblaciones por vivienda, conocer la tasa de infección actual, lo cual nos ayudará a comprender mejor la dinámica de transmisión de la enfermedad de esta población del vector en dicha región de estudio, pudiendo ofrecer una ventana de oportunidad para la prevención de brotes epidemiológicos, tanto de FD como de FHD.

## 5. MÉTODOS

### 5.1 Área de estudio

El estudio se realizó en el estado de Quintana Roo, México, que se encuentra ubicado al este del país, en la Península de Yucatán. Fueron seleccionadas dos localidades la de Cancún en el municipio de Benito Juárez y Chetumal en el municipio de Othon P. Blanco. Ambas ciudades con transmisión de denuge confirmada entre octubre y noviembre de 2012.

Cancún tienen 661,000 habitantes y Chetumal 244,000 habitantes, ambas han experimentado un rápido crecimiento en la última década, la primera ciudad es una de las que presentaron un crecimiento mayor en el país debido principalmente al turismo, se estima que llegan al año más de 6 millones de turistas donde se estima existen 32,750 habitaciones de hotel y la segunda ciudad por su importancia fronteriza con Guatemala representa un punto de paso de migrantes desde Centroamérica (INEGI 2010). El aumento del turismo exige la creación de infraestructura, incluidos hoteles y zonas residenciales. Esta actividad atrae a trabajadores migrantes de los estados vecinos, especialmente Chiapas y Oaxaca (Villafuerte-Solís et al., 2008) y de los países Centroamericanos.

Quintana Roo tiene una temperatura promedio anual de 25.5 ° C y una precipitación de 12,000 mm (INAFED 2012).

Mapa 5. Ubicación de las ciudades de Cancún y Chetumal en el estado de Quintana Roo.



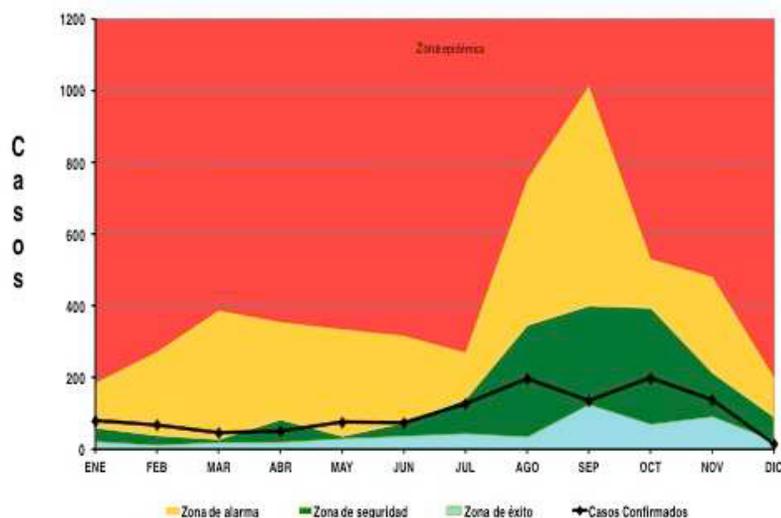
De septiembre a noviembre de 2012, la Secretaría de Salud de Quintana Roo informó un brote de dengue. En total, se notificaron 1,246 casos, de los cuales 513 se describieron como fiebre por dengue y 733 como fiebre hemorrágica por dengue (Tabla7) (CENAVECE 2012). Comparativamente el año de 2012 con el año 2011 significó un decremento del 30%(Tabla 7). Las ciudades de Cancún y Chetumal fueron las más afectadas y por eso fueron seleccionadas para el presente estudio.

Tabla.6. Comparativo de casos de dengue en el estado de Quintana Roo, México. 2011-2012.

	2011	2012
Fiebre por dengue	729	513
Fiebre hemorrágica por dengue	1,052	733
Defunciones	5	4
Letalidad (defunciones /casos de FDH)	0.48	0.55

El índice endémico para el estado en el año mostró una incidencia baja durante todo el año, estando en zona de éxito durante casi todo el año. Entre julio y noviembre se notificaron la mayoría de los casos (Gráfica 5)

Gráfica 5. Índice endémico de dengue en Quintana Roo, 2012



## **5.2 Colecta de mosquitos**

### **5.2.1. Colecta de datos**

Fueron seleccionadas 569 viviendas para el estudio, de las cuales 480 fueron de Cancún y 89 de Chetumal para la captura de mosquitos *Ae. aegypti* en su interior para buscar mosquitos hembras infectados con los virus del dengue y validar su utilización potencial como un complemento del actual sistema de vigilancia epidemiológica.

El período de recolección de mosquitos fue de octubre a diciembre de 2012. Utilizando un aspirador motorizado de tipo CDC (Clark et al., 1994). Los mosquitos adultos en reposo se buscaron dentro y fuera del hogar, por ejemplo, interiores, paredes, muebles, armarios, cortinas, persianas y lugares oscuros y húmedos donde descansan los mosquitos. Las colecciones externas incluyeron aspiraciones en jardines, vegetación y paredes de límite de las viviendas.

El tiempo promedio de recolección de mosquitos en cada casa fue de 25 minutos aproximadamente por visita. Los mosquitos atrapados se colocaron en microtubos de 2 ml con tapones de rosca y se almacenaron a  $-180^{\circ}$  C en un tanque de nitrógeno líquido. Al final del tiempo de recolección, fueron transportados en refrigeración a  $-80^{\circ}$  C en dióxido de carbono sólido por vía aérea a la Unidad de Patógenos Emergentes y Vectores del Centro de Investigación y Desarrollo en Ciencias de la Salud (CIDICS), de la Universidad Autónoma de Nuevo León en Monterrey, México.

### **5.2.2. Homogenización de mosquitos**

Se utilizaron claves taxonómicas para identificar mosquitos por especie y sexo de acuerdo a las claves de Darsie y Ward; esto se hizo en una placa fría para evitar la degradación del material genético viral. Fueron separadas las hembras de *Ae. aegypti* y se almacenaron a  $-80^{\circ}$  C hasta su procesamiento.

## **8.3. Procesamiento de biología molecular**

### **5.3.1. Técnica de RT-PCR**

La identificación molecular de DENV y sus serotipos se realizó mediante reacción en cadena de la polimerasa de transcripción inversa (RT-PCR). Para la extracción de ácido ribonucleico viral, se colocaron mosquitos en tubos Eppendorf de 0,2 ml con medio L-15 (Invitrogen, Carlsbad, CA) suplementado con suero bovino fetal al 2% (Hyclone, Logan, UT), penicilina (100 U / ml) , estreptomina (100 mg / ml) y anfotericina B (0,25 µg / ml), y se homogeneizaron durante 30 segundos utilizando un macerador eléctrico inalámbrico con mano de mortero (Daigger, Vernon Hills, IL). Se mezclaron cien microlitros de cada homogeneizado con 0,5 ml de Trizol (Invitrogen) (Chomezynski y Sacchi 1987), y se extrajo el ARN siguiendo las instrucciones del fabricante.

### **5.3.2. Electroforesis en gel de agarosa**

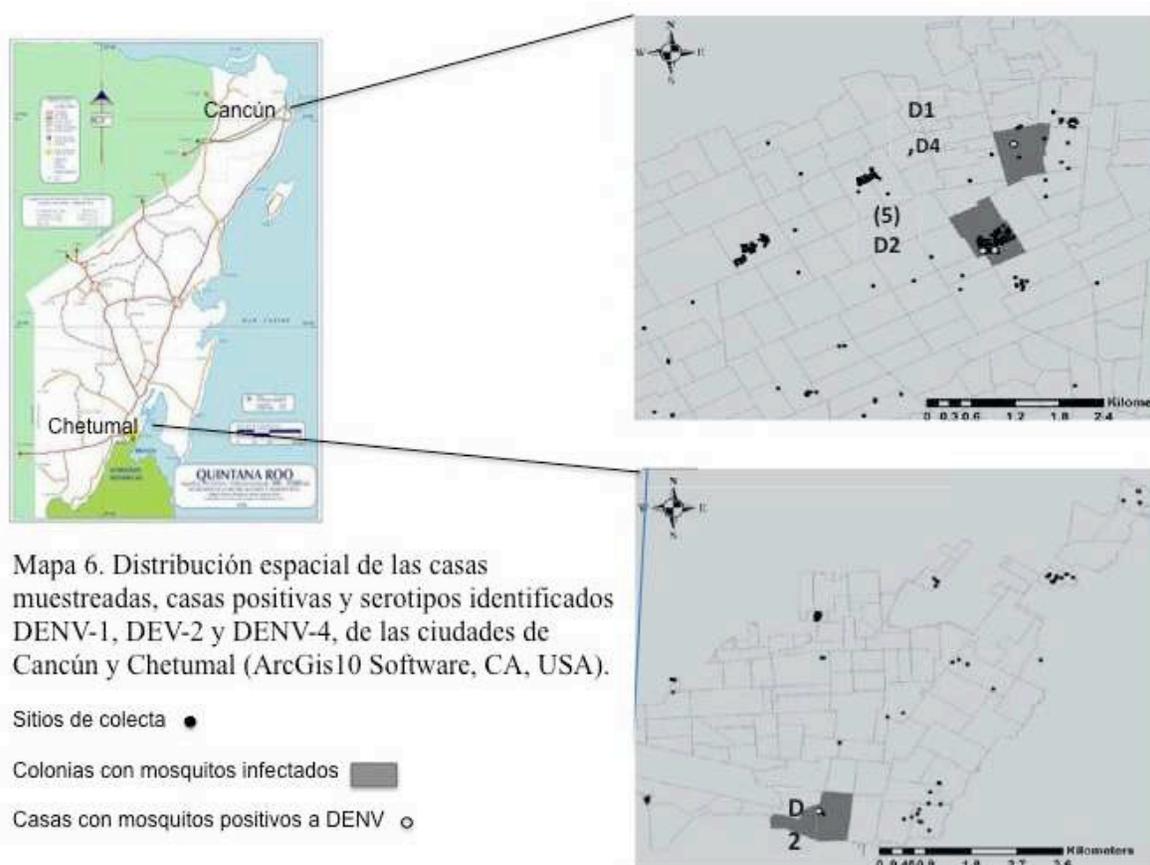
Se generó ADN complementario usando transcriptasa inversa SuperScript III (Invitrogen) y la PCR se realizó usando Taq polimerasa (Invitrogen) y cebadores específicos para la región de 470 pb del gen NS3 de los cuatro serotipos del virus del dengue (Seah et al., 1995a). Los productos de RT-PCR se tiñeron con bromuro de etidio y se visualizaron en gel de agarosa al 2,0% (Promega Corp., Madison, WI). Esta técnica molecular se usó en grupos variables de hembras de *Ae. aegypti*; por ejemplo, 6, 8, 9, 10, 11 y 17, dependiendo de la cantidad de mosquitos recolectados por hogar. El grupo positivo en el primer análisis por RT-PCR se analizó de nuevo para obtener el mosquito infectado y asociar la casa donde se recolectó y su distribución geográfica. El diagnóstico de serotipo en individuos inicialmente positivos se obtuvo con una PCR semi-anidada (Seah 1995b).

### **5.4. Tasa de infección**

Se analizaron el número y tasa de infección viral de las hembras de *Ae. aegypti* por casa. Los datos sobre casas, ubicaciones y tasas de infección se compararon y analizaron utilizando el paquete estadístico SPSS 18.0 Statistics® (SPSS Inc., Chicago, IL). La distribución espacial de los mosquitos se grafica utilizando el software ArcGIS 10.

## 9. RESULTADOS

Durante 3 meses, se tomaron muestras de un total de 569 viviendas (Tabla 7). El grupo más grande de 480 estaba en Cancún en el municipio de Benito Juárez (84.4%) y con solo 89 viviendas en el municipio en Chetumal en el municipio de Othón P. Blanco (14.6%). Las viviendas positivas para *Ae. aegypti* infectados ascendió a 445 (78.2%). En general, el porcentaje fue alto en los dos municipios: 81.7% en Benito Juárez y 59.6% en Othon P. Blanco.

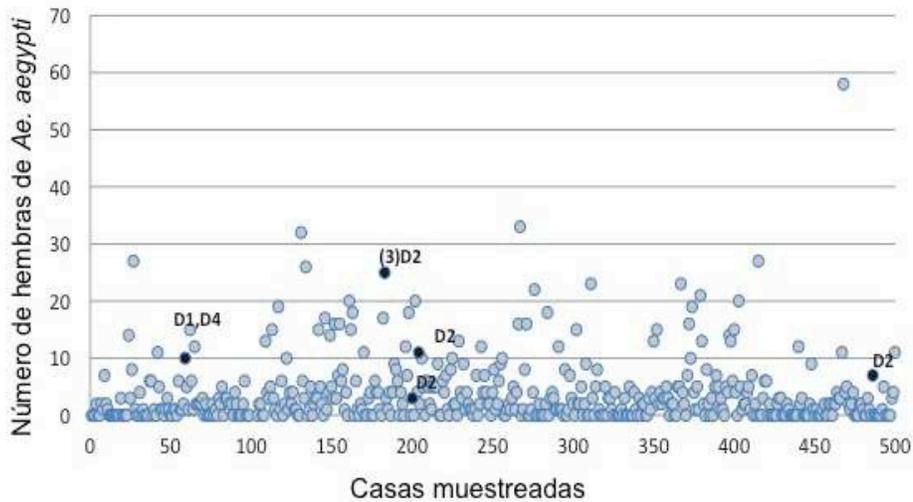


En total, fueron recolectados 4,751 hembras y machos de *Ae. aegypti*, con 4,197 (88.3%) en Benito Juárez y 554 (11.7%) de Othon P. Blanco. Del número total de mosquitos recolectados, 2,144 (45.1%) fueron hembras. La infección de las hembras de *Ae. aegypti* recolectadas por vivienda promediaron  $3.77 \pm 5.71$  en ambos lugares. Los promedios aritméticos fueron similares en Othon P. Blanco y Benito Juárez,  $3.31 \pm 4.48$  y  $3.85 \pm 5.91$ , respectivamente (Tabla 7).

Tabla.7. Distribución de hembras de *Ae. aegypti* colectadas en viviendas en los municipios de Benito Juárez y Othon P. Blanco, Quintana Roo, México. Septiembre-noviembre de 2012.

Municipio	Casas muestreadas	Casas con <i>Ae.aegypti</i>	<i>Ae. aegypti</i> colectados	<i>Ae. aegypti</i> hembras colectadas	Número de hembras/total de casas
Othón P. Blanco	89	53 (59.5%)	554	295	3.31 ± 4.48
Benito Juárez	480	392 (81.6%)	4,197	1,849	3.85 ± 5.91
TOTAL	569	445 (78.2%)	4,751	2,144	3.77 ± 5.71

La comparación de medias por análisis  $X^2$  no reveló diferencias significativas ( $t = 15,731$ ,  $df = 88,479$ ,  $P < 0,01$ ). Sin embargo, los valores promedio no mostraron la distribución agregada de *Ae. aegypti*. Curiosamente, el diagrama de dispersión de la Gráfica 6 muestra que la mitad (49.5%) de las hembras (1.061) se obtuvieron solo en 57 de las viviendas muestreadas (10.0%). El número de hembras de *Ae aegypti* en estas casas varió de 11 a 58.



Gráfica 6. Hembras de *Ae. aegypti* y hembras positivas capturadas en casas monitoreadas con el aspirador CDC y serotipos de DENV identificados en los municipios de Benito Juárez y Othón P. Blanco, Quintana Roo. Septiembre-noviembre de 2012

Al procesar los mosquitos por RT-PCR, cinco (2.3%) de los 220 grupos fueron positivos para DENV (Tabla 8). El mayor número de grupos positivos fueron 185 del

municipio de Benito Juárez, con cuatro (2.2%), y solo uno de 35 grupos de Othon P. Blanco (2.9%).

Tabla.8. Grupos de mosquitos, grupos positivos, mosquitos positivos, casas con mosquitos positivos y serotipos identificados en los municipios de Benito Juárez y Othon P. Blanco, Quintana Roo, México. Septiembre-noviembre de 2012.

Municipio	Grupos	Grupos positivos a dengue	Mosquitos positivos a dengue	Casas con mosquitos infectadas	Serotipos identificados
Othón P. Blanco	35	1 (2.9%)	1 (0.5%)	1 (0.2%)	DENV-2
Benito Juárez	185	4 (2.2%)	7 (3.2%)	4 (0.9%)	DENV-1 DENV-2 DENV-4
TOTAL	220	5 (2.3%)	8 (3.6%)	5 (1.1%)	

Los mosquitos de cada grupo positivo se analizaron individualmente con la misma técnica de RT-PCR. Con este procedimiento, relacionamos la casa donde se recolectaron los mosquitos y su posible asociación de densidad con la infección viral. Obtuvimos ocho mosquitos infectados con DENV (3.6%): siete en Benito Juárez (3.2%) y uno en Othon P. Blanco (0.5%). Para determinar qué serotipos correspondían al DENV en mosquitos individuales, utilizamos un segundo RT-PCR anidado.



Figura 12. Electroforesis de los productos de RT-PCR sobre 2% de gel agarosa. M: marcador molecular. C(-): control negativo. Serotipos D1, D2, D3, D4. Muestras (ocho) de mosquitos colectados infectados

Se encontraron tres serotipos en Benito Juárez, es decir, DENV-1, DENV-2 y DENV-4 en 7 mosquitos que correspondieron dos serotipos, DENV-1 y DENV-4; además, una casa tenía tres mosquitos con infección DENV-2. Con respecto a los resultados en Othon P. Blanco, se encontró una casa con un mosquito infectado con DENV2 que estaba en el área del centro de la ciudad (Fig. 12).

El porcentaje de infección viral de mosquitos recolectados en hogares en ambos municipios fue de 0,37%. Se encontraron porcentajes similares en Othon P. Blanco y Benito Juárez, 0.34 y 0.38%, respectivamente.

En el análisis de las densidades del vector relativas a la infección viral DENV, se observó que la mayoría de los mosquitos infectados se recogieron en hogares donde la hembra *Ae. aegypti* fueron más abundantes. Por ejemplo, tres mosquitos infectados fueron recolectados en una casa con 17 hembras de *Ae. aegypti*. De manera similar, dos mosquitos infectados fueron capturados en una casa con 10 mosquitos hembras. Se encontró un mosquito infectado en otra casa con 25 hembras. De acuerdo con hallazgos previos, el 75% (seis) de los mosquitos infectados se asoció con hogares con más mosquitos que el promedio de  $3,77 \pm 5,71$  mujeres por hogar. Solo dos (25%) mosquitos infectados fueron capturados en dos casas donde el número de mosquitos hembra estaba cerca de la media, tres y cuatro, respectivamente (Figura 2).

## 7. DISCUSIÓN

El dengue es una enfermedad que sigue incrementándose tanto su incidencia como su dispersión como ya ha sido referido. Esto quiere decir que los esfuerzos emprendidos para su control no han sido suficiente, pese a una gran cantidad de estudios e intervenciones; quizá de debe fundamentalmente a que no hemos entendido adecuadamente a la enfermedad, los virus, su entorno en donde se lleva a cabo la transmisión y sus vectores. Quizá sea necesario redescubrir la historia natural del dengue y sus vectores para poder entenderlo mejor (Brady, 2013).

Los indicadores entomológicos utilizados de rutina no nos permiten dislumbrar niveles de riesgo, por lo que buscar DENV en mosquitos podría ser un buen parámetro de riesgo. La búsqueda de mosquitos infectados en forma natural tiene muchos años, pero para ciertas enfermedades bastaba disponer de un sistema simple de captura con trampas pasivas, como ha sido el caso en su tiempo de la fiebre amarilla, del zika, de los virus de encefalitis silvestres como el virus del oeste del Nilo, virus de encefalitis equinas y otros más en donde sus vectores no son realmente urbanos o casi estrictamente domésticos y muy adaptados al ambiente humano (Dick, 1952; Dick et al 1953).

Es claro que esas técnicas utilizadas para identificar vectores silvestres infectados por arbovirus en forma natural, no pueden extrapolarse a la transmisión del dengue, en donde pudieran contribuir a mejorar el conocimiento de su vector principal, el *Aedes aegypti*, muy “domesticado”, y considerar la información como útil para poder aportar conocimiento significativo y que pudiera servir de base para diseñar medidas de control.

La información epidemiológica y entomológica del dengue y su vector, no nos han brindado los argumentos suficientes para poder diseñar un programa de control eficaz de la enfermedad, se justifica hacer una revisión exhaustiva de la epidemiología de la enfermedad y de la entomología de su vector principal en donde se puedan aportar elementos suficientes para mejorar esas medidas de control que hasta hoy no tenemos.

Aun encontrar mosquitos infectados no necesariamente significa que transmiten los virus; en este caso se requiere identificar los virus en las glándulas salivares para poder presumir la posible transmisión de los virus (Chamberlain & Sudia, 1961).

Algunos estudios que se han realizado sugieren que para encontrar un mosquito infectado se tendría un umbral de aproximadamente 1:1000 mosquitos capturados. (Gu, 2004; Gua, 2008). No obstante este diseño ha sido probado únicamente en mosquitos capturados en forma pasiva en trampas en sus diversas modalidades en mosquitos para virus que regularmente infectan a huéspedes silvestres, pero no para *Ae. aegypti*.

En el caso del dengue se han realizado estudios de campo y de gabinete para buscar mejores conocimientos de la interacción entre el huésped, el agente y su vector. Sin embargo, es reciente que se están iniciando estudios de campo para mejor conocimiento de la transmisión y poder sugerir medidas específicas que puedan controlar la enfermedad, es decir, integrar estos estudios como un instrumento más de la vigilancia epidemiológica.

La vigilancia epidemiológica es la recopilación, el análisis y la interpretación continuos y sistemáticos de los datos de salud en el proceso de descripción y monitoreo de un evento de salud. Esta información se usa para planificar, implementar y evaluar intervenciones y programas de salud pública (CDC 1988). Los datos de vigilancia se usan tanto para conocer mejor un problema de salud, como para determinar la necesidad de una acción de salud pública o evaluar la efectividad de los programas. Se aplica a grupos o poblaciones humanas para conocer magnitud y tendencias de un problema de salud, específico o general. Se generan datos que contribuyen a que los programas de control y prevención resuelvan efectivamente dicho problema. Para definir prioridades en salud, conducir investigaciones (Valenzuela).

En la opinión del suscrito, la vigilancia epidemiológica es un ejercicio permanente de actualización de la historia natural de una enfermedad para definir sus variables y las oportunidades de incidir sobre ellas para producir un control deseable y recuperación de la salud (Méndez 2006). En la Historia Natural de las Enfermedades se definen las tres variables más importantes de un evento de salud, esto es el agente o factores que producen daños a la salud, el huésped y el medio ambiente, a esto se le denomina Triada Epidemiológica. Dentro de la variable medio ambiente se incluyen elementos que pueden definir la interacción de la triada y producir enfermedad; estos elementos son Clima, Geografía, Urbanismo, Fauna y Flora, por mencionar algunos. En la Fauna se incluyen los vectores, huéspedes alternos.

El objetivo principal de la vigilancia de la salud pública es facilitar los esfuerzos preventivos o para controlar la transmisión de la enfermedad desde su aparición, propagación y resolución del problema. Otros objetivos para la vigilancia incluyen definir la severidad de la enfermedad, determinando la relación costo-efectividad de los programas de prevención de salud pública y estimando la carga de morbilidad en la comunidad. El programa de vigilancia ideal para el dengue debería ser, por lo tanto, monitorear los casos de dengue con precisión y detectar epidemias inminentes de enfermedad para desencadenar medidas preventivas suficientes (Ooi 2014) Como el dengue endémico está firmemente arraigado en todo el mundo tropical (Guzman et al., 2010), el objetivo principal de la vigilancia del dengue es producir información suficiente que pueda brindar las bases suficientes para prevenir las epidemias cíclicas que ocurren con frecuencia.

En el estudio del dengue los sistemas de vigilancia epidemiológica utilizados se dirigen a la notificación de casos y defunciones, algunos estudios de seroepidemiología, indicadores básicos entomológicos como son índices de casas positivas, de recipientes positivos y de Breteau, menos frecuente las ovitrampas, índice de pupas y mosquitos capturados en la vivienda y alrededores; en algunos casos se ha considerado variables climáticas y comportamiento de densidades de mosquitos por ejemplo (Winch et al., 1992). Pero la verdad es que con todo lo que se ha realizado para conocer el dengue sus vectores y su comportamiento, sigue dispersándose e incrementando brotes, es decir, no se ha logrado su control.

Tratando de conocer mejor el dengue se ha culpado a una variedad de factores: el crecimiento explosivo de las zonas urbanas, la globalización, los recursos gubernamentales limitados, la gestión deficiente, la capacitación inadecuada del personal de campo, la dependencia excesiva de insecticidas, la aplicación incorrecta de insecticidas, la resistencia a los insecticidas, énfasis excesivo en la intervención del gobierno y educación insuficiente del público (Gubler, 1998, 2002a, 2004, 2005, 2006, 2011; Gubler y Meltzer, 1999; Mammen et al., 2008; OMS, 2009). Detrás de muchas de estas explicaciones se encuentra la suposición ampliamente aceptada de que cualquier reducción de la población de vectores disminuirá el número de casos en algún grado, y las grandes reducciones, aunque a corto plazo, deberían detener la transmisión por completo. Muchas de las recomendaciones y la mayoría de las fallas de las campañas de control del dengue, particularmente durante las

epidemias, se pueden atribuir a este concepto erróneo (Newton y Reiter, 1992). Un ejemplo muy particular de lo anterior es el caso de Singapur donde redujeron los índices de casas positivas a criaderos del *Aedes aegypti* hasta alrededor del 1% y aún manteniéndolo así el dengue regresó y nuevamente es un problema de salud pública para ese país (Ooi 2006).

En resumen, no se conoce suficiente mente al dengue y sus vectores lo suficientemente como para diseñar un control eficiente de la enfermedad.

De acuerdo con el CDC los atributos de la vigilancia epidemiológica son ser Simples, Flexibles, Aceptables, Sensibles, tener un valor predictivo positivo, Representativo y ser Oportuno. Estos elementos aun no estan bien definidos para el caso de mosquitos *Aedes aegypti* infectados capturados en viviendas con transmisión del dengue o en áreas endémicas a dengue.

Los resultados de este estudio mostraron 78.2% de las casas en los dos sitios de estudio con *Ae. aegypti* (Tabla 1). Este hallazgo es consistente con los informes de Méndez et al. (2006) en Colombia y García-Rejón et al. (2008) en Mérida, Yucatán, que encontraron un gran número de mosquitos hembras adultas en 20 a 80% de las casas en áreas endémicas o en sus periodos epidémicos.. el patrón agregado de distribución del *Ae. aegypti* en las viviendas fue pertinente para el riesgo epidemiológico. Los mosquitos fueron abundantes en algunas viviendas y el promedio general por vivienda fue de  $3.77 \pm 5.71$ . Esto explica por qué casi la mitad (49.5%) de las 1.061 hembras de *Ae. aegypti* se obtuvieron en solo el 10.0% (57) de los hogares muestreados (Fig. 2). Scott et al. (2000) informaron el mismo patrón de agregación para ambos vectores de dengue en Tailandia. Se han documentado hallazgos similares en Brasil y en un estudio en Quintana Roo (Sánchez-Casas et al., 2013).

La tasa hembras *Ae. aegypti* infectadas por el virus del dengue fue 0.4% en este estudio. Se han documentado tasas de infección similares para *Aedes aegypti* en otras áreas endémicas (Mendez et al., 2006). García-Rejon et al. (2011) reportaron una tasa de infección de solo 1.8% en hembras de *Ae. aegypti* recolectadas entre marzo de 2007 y febrero de 2008 en el interior de las casas en Mérida, estado de Yucatán, México. La tasa mínima de infección de los mosquitos recolectados durante octubre-diciembre de 2012 fue del 0,4%.

Durante el período epidémico de septiembre-noviembre de 2012, el sistema de vigilancia epidemiológica del estado de Quintana Roo informó 375 casos, 177 de fiebre dengue y 198 de fiebre hemorrágica del dengue (CENAVECE 2013). El método utilizado en nuestra investigación detectó virus en mosquitos en las mismas ubicaciones endémicas (Seah et al., 1995a, b). La técnica molecular también identificó serotipos en mosquitos. De un total de 2.144 mosquitos *Ae. aegypti* recolectados en el interior de las viviendas en las dos localidades estudiadas, en ocho (3.6%) tuvieron la infección viral de los serotipos DENV-1, DENV-2 y DENV-4 (Tablas 1, 2). La tasa mínima de infección viral fue 0.4%, cerca del 1.8% reportado por García-Rejon et al. (2011) en ambientes domésticos en Mérida. Sin embargo, hubo varias diferencias entre los dos estudios; todos los hogares muestreados en Mérida tenían pacientes diagnosticados con virus del dengue y los mosquitos fueron procesados en grupos de 1 a 30. Guedes et al. (2010) identificaron una tasa de infección mínima más alta (10.2%) en hembras de *Ae. aegypti* recolectadas durante 18 meses en los hogares de pacientes con dengue en Brasil. Sánchez-Casas et al. (2013) reportaron 1.4% en *Ae. aegypti* en el municipio de Benito Juárez durante 2011 después del huracán Alex; el tiempo de recolección en este estudio fue de solo 1 mes.

Estos resultados son consistentes con otros estudios en Colombia y Venezuela que recomiendan el uso de la vigilancia virológica mediante RT-PCR para detectar *Ae. aegypti* infectados. Los datos tienen el potencial de ser utilizados en un sistema de alerta temprana para los brotes de dengue. Del mismo modo, Urdaneta et al. (2005) informaron en áreas con una epidemia prevalente en Venezuela, ocho de 154 grupos de mosquitos recolectados en hogares de pacientes con dengue (5.2%) y 18 de 142 grupos recolectados en casas vecinas (12%) tenían serotipos DENV-1, DENV- 3 y DENV-4. En Colombia, Mendez et al. (2006) capturaron 4.964 mosquitos, 292 y 30 grupos de *Ae. aegypti* y *Ae. albopictus* (Skuse), respectivamente. Ellos reportaron 37 (12.7%) grupos positivos de *Ae. aegypti*, encontrando los serotipos DENV-1, DENV-2 y DENV-4.

Otras ventajas de un posible sistema de vigilancia en los mosquitos infectados, complementario del actual sistema de vigilancia epidemiológica, son su capacidad de anticipar un brote y detectar el virus silente. En Venezuela, se encontraron los mosquitos infectados 8 semanas antes de que el pico de la epidemia fuera evidente (Urdaneta et al., 2005). Aunque la enfermedad desaparece en una vivienda con casos, el virus continúa

circulando en los mosquitos en estas casas, como lo demostró Garcia-Rejon et al. (2008) en donde identificaron el virus del dengue en mosquitos recolectados hasta 27 días después de que se informara el caso clínico. Además, García-Rejon et al. (2011) utilizaron el sistema de vigilancia viral para mosquitos en escuelas de Mérida, Yucatán, México, y encontraron una tasa de infección de 4.8% de *Ae. aegypti*. Hay informes de *Ae. aegypti* infectados con co-circulación de serotipos que aún no los informa el sistema de vigilancia epidemiológica. Por lo tanto, Guedes et al. (2010) en Brasil encontraron los serotipos circulantes DENV-1, DENV-2 y DENV-3 en *Ae. aegypti*, mientras que el serotipo detectado en la población humana fue DENV-3. En nuestro estudio, identificamos DENV-4 en mosquitos infectados 10 semanas antes de que fuera informado por el sistema oficial de vigilancia epidemiológica (Tabla 2). El monitoreo para identificar el virus en los mosquitos y la distribución espacial podría contribuir a mejorar la eficiencia de la implementación dirigida y oportuna del control.

La Norma Oficial Mexicana (NOM-032-SSA2-2010) y la guía internacional de la Organización Mundial de la Salud (2009) indicaron que la vigilancia epidemiológica de los casos de dengue está respaldada por el diagnóstico clínico y la vigilancia entomológica por los índices de larvas. Sin embargo, la circulación silenciosa en pacientes asintomáticos es responsable de un subregistro inquietante en hasta el 80% de los casos (Kyle y Harris 2008).

Es obvio que la población de mosquitos es un reservorio del virus y es responsable de los brotes. De manera similar, los índices larvarios reflejan pobremente el poder predictivo en la correlación entre densidades de vectores y casos humanos. Una mayor la sensibilidad del sistema de vigilancia del dengue es una prioridad en México y en los países endémicos. Otras enfermedades transmitidas por vectores, como el Virus del Oeste del Nilo, tienen sistemas de vigilancia más sólidos en cuanto a mosquitos infectados naturalmente en donde además del monitoreo clínico en humanos, se incluyen tres indicadores de la circulación del virus, tanto en huéspedes vertebrados como en mosquitos transmisores, por ejemplo, en humanos, vectores, caballos y aves (CDC 2013).

La magnitud de las epidemias de dengue exige un sistema de vigilancia más sensible además del diagnóstico de casos clínicos. Al igual que otros autores

latinoamericanos, nuestros resultados sugieren que la implementación del monitoreo de infección viral en poblaciones de *Ae. aegypti* como un indicador adicional el sistema de vigilancia podría fortalecer la actual Norma Oficial Mexicana de control del dengue.

Adicionalmente a los hallazgos en este estudio, hay informes que indican que la dependencia espacial de la incidencia del dengue y los factores socioeconómicos son críticos tanto al inicio de los estudios así como en las observaciones posteriores; también, otras variables que se relacionaron con la organización del espacio urbano también estuvieron involucradas en la ocurrencia del dengue. El uso de herramientas de análisis espacial es importante para identificar áreas críticas de control con varias variables íntimamente relacionadas con la modulación de la dinámica de la enfermedad (Mondina 2008). El diseño de estudios que conjunten información sobre incidencia, seroprevalencia de infecciones, sobre mosquitos infectados y se relacionen las variables del entorno humano son recomendaciones que se deberán observar para otros estudios.

Con esto se puede ir conformando una visión de mayor integralidad. El control del dengue esta fallando porque no conocemos con mayor precisión tanto al dengue como a su vector. La contribución de este estudio contribuye a mejorar el entendimiento de lo complejo que es el dengue y la oportunidad de mejorar el control del vector.

## 8. CONCLUSIONES

La búsqueda de mosquitos *Ae. aegypti* infectados recolectados en ambientes urbanos en viviendas de áreas endémicas, sirve como un indicador de vigilancia virológica en primer lugar, ya que en este estudio fue capaz de identificar el serotipo de DENV-4 que no se identificó en 2012 en el estado de Quintana Roo por el sistema de vigilancia de los servicios de salud.

Esta técnica tiene la ventaja de que no es invasiva, es decir no se requiere tomar muestras de sangre de personas para buscar los virus del dengue, lo que permite maximizar esfuerzos con mínimos recursos comparativamente. Es factible replicarla en diferentes partes del país para mejorar el sistema de vigilancia virológica.

La sensibilidad de esta técnica y su significado aún es necesario estandarizarla para darle un valor predictivo y que pueda medir el riesgo epidemiológico.

Esta técnica puede ofrecer una alternativa para mejorar el conocimiento de la enfermedad, su interacción con los mosquitos y su transmisión, que nos permita definir tratamientos focalizados, una vez que podamos estandarizarla.

## LITERATURA CITADA

Amaya-Larios IY, RA Martínez-Vega, SV Mayer, M Galeana-Hernández, A Comas-García, KJ Sepúlveda-Salinas, JA Falcón-Lezama, N Vasilakis, and J Ramos-Castañeda (2014). Seroprevalence of Neutralizing Antibodies Against Dengue Virus in Two Localities in the State of Morelos, Mexico. *Am J Trop Med Hyg.* 2014 Nov 5; 91(5): 1057–1065.

Arias CF, F Preugschat, JH Strauss (1993). Dengue 2 Virus NS2B and NS3 Form a Stable Complex That Can Cleave NS3 within the Helicase Domain. *Virology Volume 193, Issue 2, April 1993, Pages 888-899*

Balmaseda A; Sandoval E; Pérez L; Gutiérrez CM; Harris E. Application of molecular typing techniques in the 1998 dengue epidemic in Nicaragua. 1999; *Am J Trop Med Hyg.* 61(6):893–897.

Bates, M. (1970). *The natural history of mosquitoes.* Peter Smith. Gloucester, Mass.

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, GRW Wint, CP Simmons, TW Scott, JJ Farrar, and S Hay (2013). The global distribution and burden of dengue. *Nature.* 496(7446):504–507.

Black, W.C. IV, Bennett, K.E., Gorrochótegui-Escalante, N., Barillas-Mury, C.V., Fernández-Salas, I., de Lourdes Muñoz, M., Farfán-Alé, J.A., Olson, K.E. and Beaty, B.J. (2001) Flavivirus susceptibility in *Aedes aegypti*. *Archives of Medical Research* 33, 379–388.

Beatty, M.E., Stone, A., Fitzsimons, D.W., Hanna, J.N., Lam, S.K., Vong, S., Guzman, M.G., Mendez-Galvan, J.F., Halstead, S.B., Letson, G.W., Kuritsky, J., Mahoney, R., Margolis, H.S. and for The Asia-Pacific and Americas Dengue Prevention Boards Surveillance Working Group (2010) Best practices in dengue surveillance: a report from the Asia-Pacific and Americas Dengue Prevention Boards. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 4, e890.

Becker N, Björn Pluskota, Achim Kaiser, Francis Schaffner (2012). Exotic Mosquitoes Conquer the World. *Arthropods as Vectors of Emerging Diseases* pp 31-60| Cite as

Bressanelli, S., Stiasny, K., Allison, S.L., Stura, E.A., Duquerroy, S., Lescar, J., Heinz, F.X. and Rey, F.A. (2004) Structure of a flavivirus envelope glycoprotein in its low-pH-induced membrane fusion conformation. *EMBO Journal* 23, 728–738.

Brady OJ, et al. Refining the global spatial limits of dengue virus transmission by evidence-based consensus. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2012; 6:e1760. [PubMed: 22880140]

Brady OJ, N Golding, DM Pigott, MUG Kraemer, JP Messina, RC Reiner Jr, TW Scott, DL Smith, PW Gething and SI Hay (2014). Global temperature constraints on *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus* persistence and competence for dengue virus transmission. *Parasites & Vectors* 2014, 7:338. 7 <http://www.parasitesandvectors.com/content/7/1/338>

Brunkard JM, JL Robles López, J Ramirez, E Cifuentes, SJ Rothenberg, EA Hunsperger, CG Moore, RM Brussolo, NA Villarreal, and BM Haddad (2007). Dengue Fever Seroprevalence and Risk Factors, Texas–Mexico Border, 2004. *Emerging Infectious Diseases* • [www.cdc.gov/eid](http://www.cdc.gov/eid) • Vol. 13, No. 10, October 2007 1477-1483

Bryant JE, A E. Calvert, K Mesesan, MB Crabtree, KE Volpe, S Silengo, RM Kinney, CY-H. Huang, B R. Miller, JT Roehrig (2007). Glycosylation of the dengue 2 virus E protein at N67 is critical for virus growth in vitro but not for growth in intrathoracically inoculated *Aedes aegypti* mosquitoes. *Virology* 366 (2007) 415–423

Burke DS, A Nisalak, DE Johnson, RMcN. Scott (1988). A Prospective Study of Dengue Infections in Bangkok. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, Volume 38, Issue 1, Jan 1988, p. 172 - 180

Calisher, C.H., Karabatsos, N., Dalrymple, J.M., Shope, R.E., Porterfield, J.S., Westaway, E.G. and Brandt, W.E. (1989) Antigenic relationships between flaviviruses as determined by cross-neutralization tests with polyclonal antisera. *Journal of General Virology* 70, 37–43.

Canyon DV, JL K. Hii & R Muller (1998) Multiple host-feeding and biting persistence of *Aedes aegypti*, *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*, 92:3, 311-316,

Casals, J. and Brown, L.V. (1954) Hemagglutination with arthropod-borne viruses. *Journal of Experimental Medicine* 99, 429–449.

Capeding MR, NH Tran, SRS Hadinegoro, HHJ Muhammad Ismail, T Chotpitayasunondh, MN Chua, et al (2014). Clinical efficacy and safety of a novel tetravalent dengue vaccine in healthy children in Asia: a phase 3, randomised, observer-masked, placebo-controlled trial. *The Lancet* Vol 384:1358-1365

CENAVECE. 2013. Panorama Epidemiológico de Dengue. Secretaría de Salud. México. [http://www.dgepi.salud.gob.mx/2010/plantilla/intd\\_dengue.html](http://www.dgepi.salud.gob.mx/2010/plantilla/intd_dengue.html). Accessed 15 August 2013.

CDC. Arbovirus Catalog. In: [wwwn.cdc.gov](http://wwwn.cdc.gov) [Internet]. 2010. <http://wwwn.cdc.gov/Arbocat/Default.aspx>.

CDC (1988). GUIDELINES FOR EVALUATING SURVEILLANCE SYSTEMS. *MMWR SUPPLEMENTS* MAY 06, 1988/(S-5):1-5

CDC Guidelines for Surveillance, Prevention and Control West Nile Virus. 2013. <http://www.cdc.gov/westnile/resources/pdfs/wnvGuidelines.pdf> Accessed 15 August 2013.

DGE/SSA CENAVECE, (2014). Panorama epidemiológico del dengue.

Chadee DD (1997). Effects of forced egg-retention on the oviposition patterns of female *Aedes aegypti*(Diptera: Culicidae) . *Bulletin Of Entomological Research* 87:649-651

Chadee DD & PS Corbet (1993) The gonotrophic status and diel pattern of entry to outdoor oviposition sites of female *Aedes aegypti* (L.)(Diptera: Culicidae), *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*, 87:3, 263-268,

Chadee DD and R Martinez (2000). Landing periodicity of *Aedes aegypti* with implications for dengue transmission in Trinidad, West Indies. *Journal of Vector Ecology* 25(2): 158-163. 2000.

Chairulfatah A, D Setiabudi, R Agoes, M Sprudel, and R Colebunders (2001). Hospital based clinical surveillance for dengue haemorrhagic fever in Bandung, Indonesia. *Acta Trop* 80(2):111-115

Chamberlain RW, and WD Sudia (1961). Mechanism of transmission of viruses by mosquitoes. *Annu. Rev. Entomol.* 1961.6:371-390.

Chapman RF (1982). Chemoreception: The Significance of Receptor Numbers. *Advances In Insect Physiology* Volume 16, 1982, Pages 247-356

Christophers SR (1960). *Aedes aegypti* (L.) The yellow fever mosquito. Cambridge, at University Press.

Chomezynski, P., and N. Sacchi. 1987. Single step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate phenol chloroform extraction. *Analytical Biochem.* 162: 156-159.

Chungue E; Deubel V; Cassar O; Laille M and Martin PMV. Molecular epidemiology of dengue 3 viruses and genetic relatedness among dengue 3 strains isolated from patients with mild or severe form of dengue fever in French Polynesia. *J Gen Virol.* 1993; 74:2765-2770.

Chung Youne Kow, Lim Loo Koon, and Pang Fung Yin *Journal of Medical Entomology* Jul 2001 : Vol. 38, Issue 4, pg(s) 475- 479

Clark, G. G., H. Seda, and D. J. Gluber (1994). Use of the “CDC backpack aspirator” for surveillance of *Aedes aegypti* in San Juan, Puerto Rico. *J Am Mosq Control Assoc* 21:15-21.

Clyde K, JL Kyle, and E Harris (2006). Recent Advances in Deciphering Viral and Host Determinants of Dengue Virus Replication and Pathogenesis. *J. Virol.* December 1, 2006; 80:23

Colton YM, DD Chadee and DW Severson (2003). Natural skip oviposition of the mosquito *Aedes aegypti* indicated by codominant genetic markers. *Medical and Veterinary Entomology* (2003) 17, 195–204

Darsie, R. F. Jr., and R. A. Ward. 1981. Identification and geographical distribution of the mosquitoes of North America, north of Mexico. *Mosq. Syst. (Suppl. 1)*:1-313.

De la Mora-Covarrubias A, Jiménez-Vega F, Treviño-Aguilar SM (2010). Distribución geoespacial y detección del virus del dengue en mosquitos *Aedes* (*Stegomyia*) *aegypti* de Ciudad Juárez, Chihuahua, México. *Salud Publica Mex* 52:127-133

- DGE/ DGE/SSA. Informes epidemiológicos diversos. 1960-1978
- DGE/SSA (2000-2014). Panoramas Epidemiológicos del Dengue. México
- Dick GW, Kitchen SF, Haddow AJ (1952). Zika virus. I. Isolations and serological specific- ity. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 46:509–20
- Dick GW (1953). Epidemiological notes on some viruses isolated in Uganda; Yellow fever, Rift Valley fever, Bwamba fever, West Nile, Mengo, Semliki forest, Bunyamwera, Ntaya, Uganda S and Zika viruses. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 47:13!48.
- Kyle, J. and E. Harris. 2008. Global spread and persistence of dengue. *Annu. R. Microbiol.* 62: 71-92.
- Escobar-Mesa J, Gómez-Dantés H. Determinantes de la transmisión de dengue en Veracruz: un abordaje ecológico para su control. *Salud Publica Mex* 2003;45:43-53.
- Falgout B, Rh Miller, And Ching-Juh Lai (1993). Deletion Analysis of Dengue Virus Type 4 Nonstructural Protein NS2B: Identification of a Domain Required for NS2B-NS3 Protease Activity. *Journal of Virology*, Apr. 1993, Vol. 67, No. 4 p. 2034-2042
- Flint J, VR Racaniello, GF Rall, & AM Skalka (2009). *Principles of Virology* 3rd Edition, ASM Press Vol. 1
- Focks DA, Sackett SR, Bailey DL, Dame DA (1981). Observations on container breeding mosquitoes in New Orleans, Louisiana, whit an estimate of population density of *Aedes aegypti* (L.). *Am J Trop Med Hyg* 30:1329-35.
- Focks D (1993). In “N.R.H. Burgess and G.O. Cowan, Chapman & Hall Medical, A colour atlas of medical entomology”. *Trends in Parasitology* Volume 9, Issue 12, p478–479, December 1993
- Focks D, DG Haile, E Daniels, and GA Mount (1993). Dynamic life table madel for *Aedes aegypti* (Diptera: Cilicidae): Analysis of the literature and model development. *J Med Entomol* 30(&):1003-1017
- Focks DA, E Daniels, DG Haile, JE Keesling (1995). A simulation model of the epidemiology of urban dengue fever: literature analysis, model development, preliminary validation, and samples of simulat ion results. *Am J Trop Med Hyg* 53(5):489-506

Focks DA, RJ Brenner, J Hayes, and E Daniels (2000). Transmission thresholds for dengue in terms of aedes Aegypti pupae per person with discussion of their utility in source reduction efforts *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 62(1):11–18

Focks, D.A., 2003. A review of entomological sampling methods and indicators for dengue vectors. WHO, Geneva

Foster JE; Bennett SN; Vaughan H; Vorndam V; McMillan WO; Carrington CV. Molecular evolution and phylogeny of dengue type 4 virus in the Caribbean. *Virology*. 2003; 306(1):126–34

García-Franco F, MDL Muñoz...(2002). Large genetic distances among Aedes aegypti populations along the South Pacific coast of Mexico. *Am J Trop Med Hyg* 6(5):594-598

Garcia-Rejon J, MA Loroño-Pino, JA Farfan-Ale, L Flores-Flores, EP Rosado-Paredes, N Rivero-Cardenas, R Najera-Vazquez, S Gomez-Carro, V Lira-Zumbardo, P Gonzalez-Martinez, S Lozano-Fuentes, D Elizondo-Quiroga, BJ Beaty, and L Eisen (2008). Dengue Virus–Infected Aedes aegypti in the Home Environment. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 79(6):940–950

Gibbons, R.V., Kalanarooj, S., Jarman, R.G., Nisalak, A., Vaughn, D.W., Endy, T.P., Mammen, M.P. and Srikiatkachorn, A. (2007) Analysis of repeat hospital admissions for dengue to estimate the frequency of third or fourth dengue infections resulting in admissions and dengue hemorrhagic fever, and serotype sequences. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 77, 910–913.

Goncalvez AP; Escalante AA; Pujol FH; Ludert JE; Tovar D; Salas RA; Liprandi F. Diversity and evolution of the envelope gene of dengue virus type 1. *Virology*. 2001; 303:110–119.

Gratz NG(1991). Emergency Control Of Aedes Aegypti As A Disease Vector In Urban Areas. *J Ame Mosq Control Assoc* 7(3):353-365

Green, S. and Rothman, A. (2006) Immunopathological mechanisms in dengue and dengue hemorrhagic fever. *Current Opinion in Infectious Diseases* 19, 429–436.

Greg Bartelma and R. Padmanabhan (2002). Expression, Purification, and Characterization of the RNA 5-Triphosphatase Activity of Dengue Virus Type 2 Nonstructural Protein 3. *Virology* 299, 122–132

Gu W And RJ Novak (2004). Short report: detection probability of arbovirus infection in mosquito populations. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 71(5), 2004, pp. 636–638

Gua W, TR Unnascha, ChR Katholib, R Lampman, and RJ Novak (2008). Fundamental issues in mosquito surveillance for arboviral transmission. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 102(8): 817–822.

Gubler, D. J., and L. Rosen. (1976). A simple technique for demonstrating transmission of dengue viruses by mosquitoes without the use of vertebrate hosts. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 25:146–150.

Gubler, D.J. (1998) Dengue and dengue hemorrhagic fever. *Clinical Microbiology Reviews* 11, 480–496.

Gubler, DJ, W Suharyono, R Tan, M Abidin, and A Sie (1981). Viremia in patients with naturally acquired dengue infection. *Bull. W. H. O.* 59:623– 630.

Gubler, D.J. (1998) Dengue and dengue hemorrhagic fever. *Clinical Microbiology Reviews* 11, 480–496.

Gubler, D.J. and Meltzer, M. (1999) Impact of dengue/dengue hemorrhagic fever on the developing world. *Advances in Virus Research* 53, 35–70.

Gubler, D.J. (2002) Epidemic dengue/dengue hemorrhagic fever as a public health, social and economic problem in the 21st century. *Trends in Microbiology* 10, 100–103

Gubler, D.J. (2002) The global emergence/resurgence of arboviral diseases as public health problems. *Archives of Medical Research* 33, 330–342.

Gubler, D.J. (2002) How effectively is epidemiological surveillance used for dengue programme planning and epidemic response? *Dengue Bulletin* 26, 96–106.

Gubler, D.J. (2004) Cities spawn epidemic dengue viruses. *Nature Medicine* 10, 129–130.

Gubler DJ (2006). Dengue/dengue haemorrhagic fever: history and current status. In “New Treatment Strategies for Dengue and Other Flaviviral Diseases. Gregory R. Bock, Jamie A. Goode. John Wiley & Sons, 2 oct 2006 - 276 páginas

Gubler DJ (2011). Dengue, urbanization and globalization: The unholy trinity of the 21st century. *Tropical Medicine and Health* 39(4):3-11

Guedes, D. R. D., M. T. Cordeiro, M. A. V. Melo-Santos, T. Magalhaes, E. Marques, et al. 2010. Patient-based dengue virus surveillance in *Aedes aegypti* from Recife, Brazil. *J. Vector Borne Dis.* 47: 67-75.

Guha-Sapir D and B Schimmer (2005). Dengue fever: new paradigms for a changing epidemiology. *Emerging Themes in Epidemiology* 2005, 2:1 doi:10.1186/1742-7622-2-1. <http://www.ete-online.com/content/2/1/1>

Guzman MG, GP Kouri, J Bravo, M Soler, S Vazquez, L Morier (1990). Dengue hemorrhagic fever in cuba, 1981. A retrospective seroepidemiologic study. *Amer J Trop Med Hyg* 42(2):179-184

Guzman MG; Deubel V; Pelegrino JL; Rosario D; Marrero M; Sariol C; Kouri G (1995). Partial nucleotide and amino acid sequences of the envelope and the envelope/nonstructural protein-1 gene junction of four dengue-2 virus strains isolated during the 1981 Cuban epidemic. *Am J Trop Med Hyg.* 52(3):241–246.

Guzman, M.G., Kouri, G., Bravo, J., Valdes, L., Vazquez, S. and Halstead, S.B. (2002) Effect of age on outcome of secondary dengue 2 infections. *International Journal of Infectious Diseases* 6:118–124.

Guzman (2010). Dengue: a continuing global threat. *Nat Rev Microbiol.* 8(12 0): S7–16..

Guzman MG, Mayling Alvarez & Scott B. Halstead (2013). Secondary infection as a risk factor for dengue hemorrhagic fever/dengue shock syndrome: an historical perspective and role of antibody-dependent enhancement of infection. *Archives of Virology* July 2013, Volume 158, Issue 7, pp 1445–1459

Hammond, S.N., Balmaseda, A., Perez, L., Tellez, Y., Saborio, S.I., Mercado, J.C., Videia, E., Rodriguez, Y., Perez, M.A., Cuadra, R., Solano, S., Rocha, J., Idiaquez, W.,

Gonzalez, A. and Harris, E. (2005) Differences in dengue severity in infants, children, and adults in a 3-year hospital-based study in Nicaragua. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 73, 1063–1070.

Harrington LC, JD Edman, and TW Scott (2001). Why Do Female *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) Feed Preferentially and Frequently on Human Blood? . *J. Med. Entomol.* 38(3): 411–422 (2001)

Harrington LC, TW Scott, K Lerdthusnee, RC Coleman, A Costero, GG Clark, JJ Jones, S Kitthawee, P Kittayapong, R Sithiprasasna, and JD Edman (2005). Dispersal Of The Dengue Vector *Aedes Aegypti* Within And Between Rural Communities. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 72(2), 2005, pp. 209–220

Harris, E., Videz, E., Perez, L., Sandoval, E., Tellez, Y., Perez, M.L., Cuadra, R., Rocha, J., Idiaquez, W., Alonso, R.E., Delgado, M.A., Campo, L.A., Acevedo, F., Gonzalez, A., Amador, J.J. and Balmaseda, A. (2000) Clinical, epidemiologic, and virologic features of dengue in the 1998 epidemic in Nicaragua. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 63, 5–11.

Halstead, SB, Shotwell, H. and Casals, J. (1973) Studies on the pathogenesis of dengue infection in monkeys. I. Clinical laboratory responses to primary infection. *Journal of Infectious Diseases* 128, 7–14.

Halstead, SB, Nimmannitya, S. and Cohen, S.N. (1970) Observations related to pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. IV. Relation of disease severity to antibody response and virus recovered. *Yale Journal of Biology and Medicine* 42, 311–328.

Halstead SB (1980). Dengue haemorrhagic fever- a public health problem and a field for research. *Bulletin of the World Health Organization*, 58 (1): 1-21 (1980)

Halstead SB (2007). Dengue. *The Lancet* Volume 370, Issue 9599, 10–16 November 2007, Pages 1644-1652

Halstead, S.B., Suaya, J.A. and Shepard, D.S. (2007) The burden of dengue infection. *The Lancet* 369, 1410–1411.

Halstead SB & SN Cohen (2015). Dengue Hemorrhagic Fever at 60 Years: Early Evolution of Concepts of Causation and Treatment . *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* September 2015 vol. 79 no. 3281-291

Hammon WMc, A. Rundnick, GE Sather (1960). Viruses Associated with Epidemic Hemorrhagic Fevers of the Philippines and Thailand . *Science* 15 Apr 1960: Vol. 131, Issue 3407, pp. 1102-1103

Hawley WA, P Reiter, RS Copeland, CB Pumpuni, GB Craig Jr (1987). *Aedes albopictus* in North America: probable introduction in used tires from northern Asia. *Science* 29 May 1987: Vol. 236, Issue 4805, pp. 1114-1116 DOI: 10.1126/science.3576225

Heaton NS & G Randall (2010). Dengue Virus-Induced Autophagy Regulates Lipid Metabolism. *Cell Host & Microbe* 8, 422–432, November 18, 2010

Heinz, F.X. and Stiasny, K. (2012a) Flaviviruses and their antigenic structure. *Journal of Clinical Virology* 55, 289–295.

Holmes EC; Burch SS. The causes and consequences of genetic variation in dengue virus. *Trends Microbiol.* 2000; 8(2):74–77.

Ibañez-Bernal S (1986). Nuevo registro de altitud del *Aedes* (*Stegomyia*) *aegypti* (Linnaeus. 1762) diptera culicidae en México. *Folia Entomol Mex* 72:163-164.

INEGI. 2010. Benito Juarez, Quintana Roo.  
<http://www.inegi.org.mx/sistemas/mexicocifras/default.aspx?e=23> Accessed 15 August 2013.

Klungthong C; Zhang C; Mammen MP Jr; Ubol S; Holmes EC. The molecular epidemiology of dengue virus serotype 4 in Bangkok; Thailand. *Virology.* 2004; 329:168–179.

Kochel TJ, DM Watts, SB Halstead, CG Hayes, A Espinoza, V Felices, R Caceda, Ch T Bautista, Y Montoya, S Douglas, KL Russell (2002) Effect of dengue-1 antibodies on American dengue-2 viral infection and dengue haemorrhagic fever . *THE LANCET* 360:310-312

Kuhn RJ, W Zhang, MG Rossman et al and JH Strauss. (2002). Structure of dengue virus: Implications for flavivirus organization, maturation, and fusion. *Cell* 108:717-725.

Kummerer, B.M. and Rice, C.M. (2002) Mutations in the yellow fever virus nonstructural protein NS2A selectively block production of infectious particles. *Journal of Virology* 76, 4773–4784.

Kuno G, G-JJ Chang, KR Tsuchiya, N Karabatsos, and CB Cropp (1998). Phylogeny of the Genus *Flavivirus*. *J. Virol.* January 1998 ; 72:1 73-83

G Kuno, C B Cropp, J Wong-Lee, D J Gubler (1998). Evaluation of an IgM immunoblot kit for dengue diagnosis. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, Volume 59, Issue 5, Nov 1998, p. 757 – 762

Kurane I, Ennis FE . Immunity and immunopathology in dengue virus infections. *Seminars in Immunology* [01 Apr 1992, 4(2):121-127]

Kurane, I., Mady, B.J. and Ennis, F.A. (1991) Antibody-dependent enhancement of dengue virus infection. *Reviews in Medical Virology* 1, 211–221.

Kurukumbi M , Wali JP , Broor S , Aggarwal P , Seth P , Handa R , Dhar L , Vajapayee M (2001). Seroepidemiology and active surveillance of dengue fever/dengue haemorrhagic fever in Delhi. *Indian Journal of Medical Sciences* [01 Mar 2001, 55(3):149-156]

Kyle JL and Eva Harris (2008). *Global Spread and Persistence of Dengue*. *Annu. Rev. Microbiol.* 2008. 62:71–92

Lambrechts L, Scott TW, Gubler DJ (2010) Consequences of the Expanding Global Distribution of *Aedes albopictus* for Dengue Virus Transmission. *PLoS Negl Trop Dis* 4(5): e646. doi:10.1371/journal.pntd.0000646

Lanciotti RS; Lewis JG; Gubler DJ; Trent DW. Molecular evolution and epidemiology of dengue-3 viruses. *J Gen Virol.* 1994; 75:65–75.

Lanciotti RS; Gubler DJ; Trent DW. Molecular evolution and phylogeny of dengue-4 viruses. *J Gen Virol.* 1997; 78:2279–2286.

Lescar J and S-M Lok (2014). Chapter 19 The Structural Biology of Dengue Virus pp Gubler DJ & EE Ooi In “Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever 2nd Edition pag 384”

Leung, J.Y., Pijlman, G.P., Kondratieva, N., Hyde, J., Mackenzie, J.M. and Khromykh, A.A. (2008) Role of nonstructural protein NS2A in flavivirus assembly. *Journal of Virology* 82, 4731–4741.

Lewis JA; Chang GJ; Lanciotti R; Kinney RM; Mayer LW; Trent DW. Phylogenetic relationships of dengue-2 viruses. *Virology*. 1993; 197:216–224.

Li, L., Lok, S.M., Yu, I.M., Zhang, Y., Kuhn, R.J., Chen, J. and Rossmann, M.G. (2008) The flavivirus precursor membrane-envelope protein complex: structure and maturation. *Science* 319, 1830–1834.

Lindembach BD, CL Murray, HJ Thiel & CMrice (2007) In “Cohen JI, DE Griffin, RA Lamb, MA Martin, VR Racaniello & B Roizman. *Fields Virology*. 6Th Edition Wolters Kluwer/Lippicott Williams & Wilkins”

Leon Rosen (1988). Further Observations on the Mechanism of Vertical Transmission of Flaviviruses by *Aedes* Mosquitoes. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, Volume 39, Issue 1, Jul 1988, p. 123 – 126

Lindenbach, B.D. and Rice, C.M. (2003) Molecular biology of flaviviruses. *Advances in Virus Research* 59, 23–61.

Liotta dj, G Cabanne, R Campos, SA Tonon (2005). Molecular detection of dengue viruses in field caught *Aedes aegypti* mosquitoes from northeastern Argentina. *Rev Latinam Microbio* Vol. 47, Nos. 3-4 July - September. 2005 October - December. 2005 pp. 82 – 8

Liu, W.J., Chen, H.B. and Khromykh, A.A. (2003) Molecular and functional analyses of Kunjin virus infectious cDNA clones demonstrate the essential roles for NS2A in virus assembly and for a non-conservative residue in NS3 in RNA replication. *Journal of Virology* 77, 7804–7813.

Liu, W.J., Wang, X.J., Mokhonov, V.V., Shi, P.Y., Randall, R. and Khromykh, A.A. (2005) Inhibition of interferon signaling by the New York 99 strain and Kunjin

subtype of West Nile virus involves blockage of STAT1 and STAT2 activation by nonstructural proteins. *Journal of Virology* 79, 1934–1942.

Lloyd-Smith JO, Schreiber SJ, Kopp PE, Getz WM (2005) Superspreading and the effect of individual variation on disease emergence. *Nature* 438: 355–359.

Luca, V.C., AbiMansour, J., Nelson, C.A. and Fremont, D.H. (2011) Crystal structure of the Japanese encephalitis virus envelope protein. *Journal of Virology* 86, 2337–2346.

Mackenzie, J.M., Khromykh, A.A., Jones, M.K. and Westaway, E.G. (1998) Subcellular localization and some biochemical properties of the flavivirus Kunjin nonstructural proteins NS2A and NS4A. *Virology* 245, 203–215.

Mackenzie JS, DJ Gubler & LR Petersen (2004). Emerging flaviviruses: the spread and resurgence of Japanese encephalitis, West Nile and dengue viruses. *Nature Medicine Supplement* 10(12)

Mackenzie, J.M., Jones, M.K. and Young, P.R. (1996) Immunolocalization of the dengue virus nonstructural glycoprotein NS1 suggests a role in viral RNA replication. *Virology* 220, 232–240.

Mamani Zapana EW. Identificación de genotipos y linajes de los cuatro serotipos del virus dengue en el Perú durante los años 1998 – 2012. TESIS Para optar el Grado Académico de Doctor en Ciencias Biológicas. Lima – Perú 2013 UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

Mammen MP Jr, Pimgate C, Koenraadt CJM, Rothman AL, Aldstadt J, et al. (2008) Spatial and temporal clustering of dengue virus transmission in Thai villages. *PLoS Med* 5(11): e205. doi:10.1371/journal.pmed.0050205  
Martina BEE, P Koraka, and ADME Osterhaus (2009). Dengue Virus Pathogenesis: an Integrated View. *Clinical Microbiology Reviews*, Oct. 2009, p. 564–581

Martinez T and HH Hagedorn (1987). Development of Responsiveness to Hormones After a Blood Meal in the Mosquito *Aedes aegypti*. *Insect Biochem.* Vol. 17, No. 7, pp. 1095-1098, 1987

McDonald P T (1977). Population characteristics of domestic *Aedes aegypti* (Diptera : Culicidae) in villages on the Kenya coast. Adult survivorship and population size. *J. Med. Entomol.* Vol. 14, no. 1 : 42-48

Méndez-Galván J y R Montesano-Castellanos (1994). Manual para la vigilancia epidemiológica del dengue, la fiebre hemorrágica del dengue y los mosquitos vectores. DGE/SSA

Méndez Galván JF (2006). Dengue. In “ Tapia-Conyer R El Manual de Salud Pública, Segunda Edición, Inter-sistemas Editores, pag 381”

Méndez Galván J (2006). Dengue en “Infectología Clínica de Kumate-Gutiérrez, XIV. Infecciones Virales, pag. 591”

Mendez, F., M. Barreto, J. F. Arias, G. Rengifo, J. Munoz, M. E. Burbano, and B. Parra. 2006. Human and mosquito infections by dengue viruses during and after epidemics in a dengue-endemic region of Colombia. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 74: 678-683.

Messer WB; Gubler DJ; Harris E; Sivananthan K; de Silva A. Emergence and global spread of a dengue serotype 3; subtype III virus. *Emer. Infect. Dis.* 2003; 9; 800–809.

Modis, Y., Ogata, S., Clements, D. and Harrison, S.C. (2004) Structure of the dengue virus envelope protein after membrane fusion. *Nature* 427, 313–319.

Modis, Y., Ogata, S., Clements, D. and Harrison, S.C. (2003) A ligand-binding pocket in the dengue virus envelope glycoprotein. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 100, 6986–6991.

Mondini A, F Chiaravalloti-Neto (2008). Spatial correlation of incidence of dengue with socioeconomic, demographic and environmental variables in a Brazilian city. *Science Of The Total Environment* 393:241–248

Morrison AC, Getis A, Santiago M, Rigau-Perez JG, Reiter P. (1998). Exploratory space-time analysis of reported dengue cases during an outbreak in Florida, Puerto Rico, 1991–1992. *Am J Trop Med Hyg* 58:287–98.

Morrison AC, Costero A, Edman JD, Clark GG, Scott TW (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 [01 Jun 1999, 15(2):98-104]

Morrison AC, K Gray, A Getis, H Astete, M Sihuincha, D Focks, D Watts, JD Stancil, JG Olson, P Blair, and Thomas W. Scott (2004). Temporal and Geographic Patterns of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) Production in Iquitos, Peru. *J. Med. Entomol.* 41(6): 1123–1142 (2004)

Morrison AC, Gray K, Getis A, Astete H, Shiincha M, Focks D, et al. (2004). Temporal and geographic patterns of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) production in Iquitos, Peru. *J Med Entomol* 41:1123–42.

Morrison AC, Minnick SL, Rocha C, Forshey BM, Stoddard ST, et al. (2010) Epidemiology of Dengue Virus in Iquitos, Peru 1999 to 2005: Interepidemic and Epidemic Patterns of Transmission. *PLoS Negl Trop Dis* 4(5):

Morrison, A.C., Zielinski-Gutierrez, E., Scott, T.W. and Rosenberg, R. (2008) Defining challenges and proposing solutions for control of the virus vector *Aedes aegypti*. *PLoS Medicine* 5, e68.

Munoz-Jordan, J.L., Laurent-Rolle, M., Ashour, J., Martinez-Sobrido, L., Ashok, M., Lipkin, W.I. and Garcia-Sastre, A. (2005) Inhibition of alpha/beta interferon signaling by the NS4B protein of flaviviruses. *Journal of Virology* 79, 8004–8013.

Nelson M (1986). *Aedes aegypti*: Biología y Ecología. OPS/OMS.

Newton, E.A. and Reiter, P. (1992) A model of the transmission of dengue fever with an evaluation of the impact of ultra-low volume (ULV) insecticide applications on dengue epidemics. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 47, 709–720.

Nomaguchi M, M Ackermann, C Yon, S You, and R. Padmanabhan (2003). De Novo Synthesis of Negative-Strand RNA by Dengue Virus RNA-Dependent RNA Polymerase In Vitro: Nucleotide, Primer, and Template Parameters. *J. Virol.* October 2003 ; 77:19

Norma Oficial Mexicana NOM-032-SSA2-2010. Para la vigilancia epidemiológica, prevención y control de las enfermedades transmitidas por vector.

[http://dof.gob.mx/nota\\_detalle.php?codigo=5192591&fecha=01/06/2011](http://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5192591&fecha=01/06/2011) Accessed 15 August 2013.

OMS/TDR (2010) Dengue: Guías para el diagnóstico, tratamiento, prevención y control

Ooi EE, K-T Goh, and DJ Gubler (2006). Dengue Prevention and 35 Years of Vector Control in Singapore Emerging Infectious Diseases Vol. 12, No. 6, 887-

Ooi EE (2014), Chapter 4 Surveillance for Dengue In “Duane J. GublerEng Eong Ooi, Subhash VasudevanJeremy Farrar (2014). Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever 2nd Edition CABI”

Panyasrivanit, M., Khakpoor, A., Wikan, N. and Smith, D.R. (2009) Co-localization of constituents of the dengue virus translation and replication machinery with amphisomes. Journal of General Virology 90, 448–456.

Platt, K. B., K. J. Linthicum, K. S. A. Myint, B. L. Innis, K. Lerdthusnee, and D. W. Vaughn. 1997. Impact of dengue virus infection on feeding behavior of *Aedes aegypti*. Am. J. Trop. Med. Hyg. 57:119–125

Putman JL, TW Scott (1995). Blood-Feeding Behavior of Dengue-2 Virus-Infected *Aedes Aegypti*. The American Society of Tropical Medicine and Hygiene Volume 52, Issue 3, p. 225 - 227

Ramos MM, Mohammed H, Zielinski-Gutierrez E, Hayden MH, Lopez JL, Fournier M, Trujillo AR, Burton R, Brunkard JM, Anaya-Lopez L, Banicki AA, Morales PK, Smith B, Muñoz JL, Waterman SH; Dengue Serosurvey Working Group (2008). Epidemic dengue and dengue hemorrhagic fever at the Texas-Mexico border: results of a household-based seroepidemiologic survey, December 2005. Am J Trop Med Hyg. 2008 Mar;78(3):364-9.

Reiter P, MA Amador, RA Anderson, GG Clark (1995). Short Report: Dispersal of *Aedes aegypti* in an Urban Area after Blood Feeding as Demonstrated by Rubidium-Marked Eggs. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, Volume 52, Issue 2, Feb 1995, p. 177 – 179

Reiter P, S Lathrop, M Bunning, B Biggerstaff, D Singer, T Tiwari, L Baber, M Amador, J Thirion, J Hayes, C Seca, J Mendez, B Ramirez, J Robinson, J Rawlings, V

Vorndam, S Waterman, D Gubler, G Clark, and E Hayes (2003). Texas Lifestyle Limits Transmission. *Emerging Infectious Diseases* Vol. 9, No. 1, 86-89

Reiter P (2007) Oviposition, dispersal, and survival in *Aedes aegypti* : implications for the efficacy of control strategies. *Vector-borne and Zoonotic Diseases* 7, 261–273.

Rey, F.A., Heinz, F.X., Mandl, C., Kunz, C. and Harrison, S.C. (1995) The envelope glycoprotein from tick-borne encephalitis virus at 2 Å resolution. *Nature* 375, 291–298.

Rico-Hesse R. Molecular evolution and distribution of dengue viruses type 1 and 2 in nature. *Virology*. 1990; 174:479–493.

Rico-Hesse R. Microevolution and virulence of dengue viruses. *Adv Virus Res.* 2003; 59:315–341.

Rigau-Pérez JG, Gary G Clark, Duane J Gubler, Paul Reiter, Eduard J Sanders, A Vance Vorndam (). Dengue and dengue haemorrhagic fever. *THE LANCET* • Vol 352 • September 19, 1998

Rodhain F, Rosen L. Mosquito vectors and dengue virus-vector relationships. En: Gubler DJ, Kuno G, editors. *Dengue and dengue hemorrhagic fever*. Cambridge: Ed. University Press; 1997. p. 45-61.

Rothman AL, (2004). Dengue: defining protective versus pathologic immunity. *The Journal of Clinical Investigation* <http://www.jci.org> Volume 113 Number 7 April 2004

Rudnick A. The ecology of the dengue virus complex in peninsular Malaysia; p.7. In T. Pang and R. Pathmanathan (ed.); *Proceedings of the International Conference on Dengue/DHF*. University of Malaysia Press; Kuala Lumpur; Malaysia. 1984.

Sabin, A.B. (1952) Research on dengue during World War II. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 1, 30–50.

Samuel PP & BK Tyagi (2006). Diagnostic methods for detection & isolation of dengue viruses from vector mosquitoes *Indian J Med Res* 123, May 2006, pp 615-628

Sanchez-Casas, R. M., R. H. Alpuche, B. J. Blitvich, E. E. Diaz, R. Ramirez, E. Zarate, O. Sanchez, M. Laguna, M. Alvarado, L.A. Ibarra, C.E. Medina, M.A. Lorono, M.

A. Dominguez, P. Mis, and I. Fernandezl. 2013. Detection of Dengue Virus Serotype 2 in *Aedes aegypti* in Quintana Roo, Mexico, 2011. Southwest. Entomol. 38: 109-117.

Sangiambut, S., Keelapang, P., Aaskov, J., Puttikhunt, C., Kasinrer, W., Malasit, P. and Sittisombut, N. (2008) Multiple regions in dengue virus capsid protein contribute to nuclear localization during virus infection. Journal of General Virology 89, 1254–1264.

Schliessman DJ & LB Calheiros (1974). A review of the status of yellow fever and *Aedes aegypti* eradication programs in The Americas. Mosq. News 34:1-9

Scott TW, E Chow, D Strickman, PP Kittayapong, RA Wirtz, LH Lorenz, And JD Edman (1993). Blood-Feeding Patterns of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) Collected in a Rural Thai Village. J. Med. Entomol. 30(5): 922-927

Scott, T. W., A. Naksathit, J. F. Day, P. Kittayapong, and J. D. Edman (1997). A fitness advantage for *Aedes aegypti* and the viruses it transmits when females feed only on human blood. Am. J. Trop. Med. Hyg. 57:235–239.

Scott TW, PH Amerasinghe, AC Morrison, LH Lorenz, GG Clark, D Strickman, P Kittayapong, and JD Edman (2000). Longitudinal Studies of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) in Thailand and Puerto Rico: Blood Feeding Frequency. Source: Journal of Medical Entomology, 37(1):89-101. 2000.

Scott TE and AC Morrison (2003). *Aedes aegypti* density and the risk of dengue-virus transmission. Chapter 14 Siler, J. F. ; Hall, M. W. ; Hitchens, A. P. (1926) Dengue: Its History, Epidemiology, Mechanism of Transmission, Etiology, Clinical Manifestations, Immunity, and Prevention. Philipp. J. Sci 1926 Vol.29 No.1-2 pp.1-304 pp.

Scott TW and AC Morrison (2010). Vector Dynamics and Transmission of Dengue Virus: Implications for Dengue Surveillance and Prevention Strategies Vector Dynamics and Dengue Prevention. In “A.L. Rothman (ed.), Dengue Virus, Current Topics in Microbiology and Immunology 338, DOI 10.1007/978-3-642-02215-9\_9, # Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2010”

Seah CLK, VTK Chow, and YC Chan. 1995. Semi-nested PCR using NS3 primers for the detection and typing of dengue viruses in clinical serum specimens. Clin. Diagn. Virol. 4: 113-120.

Seah CLK, VTK Chow, HC Tan, and YC Chan. 1995. Rapid, single step RT-PCR typing of dengue viruses using five NSE gene primers. *J. Virol. Methods* 51: 193-200.

Sithiprasasna R, S Patpoparn, W Attatippaholkun, S Suvannadabba and M Srisuphanunt (2004). The geographic information system as an epidemiological tool in the surveillance of dengue virus-infected aedes mosquitos Southeast Asian J Trop Med Public Health Vol 35 No. 4 918 -December 2004

Southwood TRE, G Murdie, M Yasuno, RJ Tonn & PM Reader. Studies on the life budget of *Aedes aegypti* in Wat Samphaya, Bangkok, Thailand. *Bull Wld Heth Org* 1972, 46, 211-226

Suárez MF, and MJ Nelson (1981). Registro de altitud del *Aedes Aegypti* en Colombia. *Biomédica (Colombia)* Vol. 1, Núm. 4

Ong SH. Molecular Epidemiology of Dengue Viruses from Complete Genome Sequences. Basel (2010). Original document stored on the publication server of the University of Basel edoc.unibas.ch

Tapia-Conyer R, JF Méndez-Galván, H Gallardo-Rincón (2009). The growing burden of dengue in Latin America *Journal of Clinical Virology* 46, S2 (2009) S3–S6

Tapia-Conyer R, M Betancourt-Cravioto & J Méndez-Galván (2012) Dengue: an escalating public health problem in Latin America, *Paediatrics and International Child Health*, 32:sup1, 14-17, DOI: 10.1179/2046904712Z.00000000046

Torres-Muñoz A. Yellow fever in Mexico. The eradication of *Aedes aegypti*. 1966. *Salud Publica Mex* 1995;37(Suppl):S103-10; discussion S98.

Twiddy SS; Farrar JJ; Nguyen VC; Wills B; Gould; EA; Gritsun T; Lloyd G; Holmes EC. Phylogenetic relationships and differential selection pressures among genotypes of dengue-2 virus. *Virology*. 2002; 298:63–72.

Undurraga EA, Betancourt-Cravioto M, Ramos-Castañeda J, Martínez-Vega R, Méndez-Galván J, Gubler DJ, et al. (2015) Economic and Disease Burden of Dengue in Mexico. *PLoS Negl Trop Dis* 9(3): e0003547. doi:10.1371/journal.pntd.0003547

Undurraga, E.A., Halasa, Y.A. and Shepard, D.S. (2013) Use of expansion factors to estimate the burden of dengue in southeast Asia: a systematic analysis. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 7, e2056

Urdaneta, L., F. Herrera, M. Pernalete, N. Zoghbi, Y. Rubio, R. Barrios, J. Rivero, G. Comach, M. Jimenez, 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. *Ing. Gen. Evol.* 5: 177-184  
Usuku S; Castillo L; Sugimoto C; Noguchi Y; Yogo Y; Kobayashi N. Phylogenetic analysis of dengue-3 viruses prevalent in Guatemala during 1996-1998. *Arch Virol.* 2001; 146:1381–1390.

Vaughn DW. Dengue lessons from Cuba. *Am J Epidemiol.* 2000; 125(9):800– 803.

Valenzuela MT  
[https://www.sabin.org/sites/sabin.org/files/oct21\\_1000valenzuela.pdf](https://www.sabin.org/sites/sabin.org/files/oct21_1000valenzuela.pdf)

van der Schaar, H.M., Rust, M.J., Chen, C., van der Ende-Metselaar, H., Wilschut, J., Zhuang, X. and Smit, J.M. (2008) Dissecting the cell entry pathway of dengue virus by single-particle tracking in living cells. *PLoS Pathogens* 4, e1000244.

Vasilakis N; Cardoso J; Hanley KA et al. Fever from the forest: prospects for the continued emergence of sylvatic dengue virus and its impact on public health. *Nat Rev Microbiol.* 2011; doi: 10.1038/nrmicro2595

Villafuerte-Solís, D., A. García, and M. Carmen. 2008. Algunas causas de la migración internacional. *Chiapas Economía y Sociedad* 14: 41-58. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, México.

Vitek CJ, Gutierrez JA, Dirrigl FJ Jr. (2014). Dengue vectors, human activity, and dengue virus transmission potential in the lower Rio Grande Valley, Texas, United States. *J Med Entomol.* 2014 Sep;51(5):1019-28.

Wang E; Ni H; Xu R; Barrett AD; Watowich SJ; Gubler DJ; Weaver SC. Evolutionary relationships of endemic/epidemic and sylvatic dengue viruses. *J Virol.* 2000; 74(7):3227–3234.

Waterman SH, DJ Gubler (1989). Dengue fever. *Dermatology.* 7(1):117-122

Watts DM, DS Burke, BA Harrison, RE Whitmire, and A Nisalak (1987). Effect of temperature on the vector efficiency of *Aedes aegypti* for dengue 2 virus. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 36(1), 1987, pp. 143-152

Watts DM, P Putvatana, B Vasquez, C Calampa, C Hayes, SB Halstead (1999). Failure of secondary infection with American genotype dengue 2 to cause dengue haemorrhagic fever. *The Lancet* Volume 354, Issue 9188, 23 October 1999, Pages 1431-1434

Westaway, E. G., and J. Blok. 1997. Taxonomy and evolutionary relationships of flaviviruses, p. 147–173. In “D. J. Gubler and G. Kuno (ed.), *Dengue and dengue hemorrhagic fever*. CAB International, London, United Kingdom”.

Westaway, EG, Mackenzie, JM, Kenney, M.T., Jones, M.K. and Khromykh, A.A. (1997) Ultrastructure of Kunjin virus-infected cells: colocalization of NS1 and NS3 with double-stranded RNA, and of NS2B with NS3, in virus-induced membrane structures. *Journal of Virology* 71, 6650–6661.

Winch PJ, G. Barrientos-Sánchez, E. Puigserver-Castro, L. Manzano-Cabrera, L.S. Lloyd and J.F. 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(2):193-195

WHO (2009). *Dengue guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control*. Geneva, Switzerland.

WHO (2012). *Global strategy for dengue prevention and control 2012-2020*.

Xu, Z., Anderson, R. and Hobman, T.C. (2011) The capsid-binding nucleolar helicase DDX56 is important for infectivity of West Nile virus. *Journal of Virology* 85, 5571–5580.

Yang, J.S., Ramanathan, M.P., Muthumani, K., Choo, A.Y., Jin, S.H., Yu, Q.C., Hwang, D.S., Choo, D.K., Lee, M.D., Dang, K., Tang, W., Kim, J.J. and Weiner, D.B. (2002) Induction of inflammation by West Nile virus capsid through the caspase-9 apoptotic pathway. *Emerging Infectious Diseases* 8, 1379–1384.

Zhang, Y., Zhang, W., Ogata, S., Clements, D., Strauss, J.H., Baker, T.S., Kuhn, R.J. and Rossmann, M.G. (2004) Conformational changes of the flavivirus E glycoprotein. *Structure* 12, 1607–1618.

INAFED. 2012. Enciclopedia de los Municipios de México “Benito Juárez”. <http://www.inafed.gob.mx/work/templates/enciclo/qroo/Mpios/23005a.htm> Accessed 15 August 2013

## **RESUMEN BIOGRÁFICO**

**Datos Personales:** Lugar y fecha de Nacimiento. México Distrito Federal, 18 de marzo de 1951.

### **Educación:**

Médico Cirujano, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de México 1971-1976

Maestro en Salud Pública, Escuela de Salud Pública de México, SSA 1978

Master in Health Sciences, The Johns Hopkins University, 1988-1990

### **Experiencia Profesional:**

Director Fundador del Centro de Investigaciones de Paludismo (ahora Centro Regional de Investigaciones en Salud Pública-INSP/SSA). 1980-1986.

Director de Servicios de Salud, Secretaría de Salud del estado de Chiapas 1993

Jefe del Departamento de Vigilancia Epidemiológica de Enfermedades Transmitidas por Vectores, Dirección General de Epidemiología, SSA. 1994

Director del Programa Nacional de Prevención y Control de Enfermedades Transmitidas por Vectores, SSA. 1997-2006.

Médico Especialista e Investigador en el Hospital Infantil de México Federico Gómez, SSA. 2007 a la fecha.

Miembro del Sistema Nacional de Investigadores CONACyT, Nivel 1. 2007 a la fecha.

Inscrito en el Curso de Doctorado en Ciencias con Enfoque en Entomología Médica, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León. 2009-

**ARTICULOS PUBLICADOS.....**

Jorge Méndez-Galván, Rosa M. Sánchez-Casas, Alejandro Gaitan-Burns, Esteban E. Díaz-González, Luis A. Ibarra-Juarez, Carlos E. Medina de la Garza, Marco Domínguez-Galera, Pedro Mis-Ávila, and Idefonso Fernández-Salas (2014). **Detection of *Aedes aegypti* Mosquitoes Infected with Dengue Virus as a Complementary Method for Increasing the Sensitivity of Surveillance: Identification of Serotypes 1, 2, and 4 by RT-PCR in Quintana Roo, Mexico.** SOUTHWESTERN ENTOMOLOGIST VOL. 39, NO. 2 pp 307-316