

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



IDENTIFICACIÓN DEL VIRUS DEL DENGUE EN POBLACIONES DE
***Aedes albopictus* EN GUADALUPE Y SANTIAGO, NUEVO LEÓN**

POR

Q.B.P. OLGA SARAÍ SÁNCHEZ RODRÍGUEZ

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

DICIEMBRE, 2015

IDENTIFICACIÓN DEL VIRUS DEL DENGUE EN POBLACIONES DE *Aedes albopictus* EN GUADALUPE Y SANTIAGO, NUEVO LEÓN

COMITÉ DE TESIS

Dr. Raúl Torres Zapata
Director de tesis

Dr. Gustavo Ponce García
Secretario

Dr. Ildefonso Fernández Salas
Vocal

Dr. Roberto Mercado Hernández
Vocal

Dr. Eduardo A. Rebollar Téllez
Vocal

Dra. Ana Ma. Gpe. Rivas Estilla
Director externo

**TRANSMISIÓN VERTICAL DEL VIRUS DEL DENGUE EN *Aedes albopictus*
EN EL NORTESTE DE MÉXICO**

Comité Académico de Doctorado

Subdirector de Estudios de Posgrado

INDICE

CONTENIDO	PÁGINA
1. RESUMEN	1
2. ABSTRACT	2
3. INTRODUCCIÓN	3
4. HIPOTESIS	5
5. OBJETIVOS	6
5.1. OBJETIVO GENERAL	6
5.2 OBJETIVOS PARTICULARES	6
6. ANTECEDENTES	7
6.1. Historia epidemiológica del dengue	7
6.1.1 Dengue en el mundo	7
6.1.2 Dengue en el continente Americano	8
6.1.3. Dengue en México	10
6.2. El vector <i>Ae. albopictus</i>	11
6.2.1. Posición taxonómica de <i>Aedes albopictus</i>	11
6.2.2. Biología de <i>Ae. albopictus</i>	12
6.2.3. Distribución geográfica de <i>Ae. albopictus</i>	16
6.2.4. Rango de vuelo	18
6.2.5. Hábitat de <i>Ae. albopictus</i>	18
6.2.6. Preferencia de hospederos	19
6.2.7. Importancia de <i>Ae. albopictus</i>	20
6.2.8. Identificación de adultos <i>Aedes aegypti</i> y <i>Aedes albopictus</i>	22
6.2.9. Virus del dengue	22
7. MATERIAL Y MÉTODO	25
7.1. Áreas de estudio	25
7.2. Colecta de huevos con ovitrampas	27
7.3. Cría de mosquitos procedentes de ovitrampas	28
7.4. Colecta de mosquitos adultos con aspirador de espalda	30

7.5. Identificación molecular de DENV a partir de adultos provenientes de ovitrampas y adultos en reposo de <i>Ae. albopictus</i> y <i>Ae. aegypti</i>	31
7.5.1. Macerado de mosquitos	31
7.5.2. Extracción de RNA	32
7.6. Detección de RNA viral	33
7.6.1. Retrotranscripción	33
7.6.2. Serotipificación del dengue	35
7.6.3. Determinación de serotipos virales por medio de PCR anidada	37
7.6.4. Análisis de los productos de PCR por electroforesis	38
7.6.5. Aislamiento viral en células C6/36 a partir de macerado de mosquitos	39
7.7. Análisis estadístico	40
8. RESULTADOS	41
8.1 Colecta de huevos con ovitrampas	41
8.2 Colecta de mosquitos adultos con aspirador de espalda	44
8.3 Detección de virus del dengue por RT-PCR	47
8.4 Cultivo celular C6/36 con macerado de mosquitos infectados	50
9. DISCUSIÓN	51
10. CONCLUSION	54
11. LITERATURA CITADA	55

INDICE DE FIGURAS

Fig. 1. Países y áreas de riesgo del dengue alrededor del mundo al 2007	8
Fig. 2. Ciclo biológico de <i>Ae. albopictus</i>	12
Fig. 3. Tipo de criadero natural de <i>Ae. albopictus</i> en plantas.....	15
Fig. 4. Distribución mundial de <i>Ae. albopictus</i> hasta el año 2007	18
Fig. 5. Comparación de patrones del tórax entre <i>Ae. aegypti</i> y <i>Ae. albopictus</i>	22
Fig. 6. Organización genómica del virus del dengue.....	24
Fig. 7. Mapa del estado de Nuevo León representando los dos municipios de estudio..	25
Fig. 8. Representación gráfica de las ovitrampas	27
Fig. 9. Arribo de ovitrampas al laboratorio para la cuantificación de oviposición.....	28
Fig. 10. Mesa de enfriamiento de apoyo para identificar especies de mosquitos.....	29
Fig. 11. Pools de mosquitos almacenados a -80°C	29
Fig. 12. Colecta de mosquitos con aspirador de espalda	30
Fig. 13. Procedimiento realizado en campana de flujo laminar para la preparación de reactivos	31
Fig. 14. Reactivos y columnas del Kit comercial QIAshredder y RNeasy para la extracción de RNA total	32
Fig. 15. Biofuge para el proceso de centrifugación de muestras en frío.....	33
Fig. 16. Preparación de reactivo para RT-PCR.....	34
Fig. 17. Cámara electroforética utilizada y colocación de muestras en gel de agarosa..	39
Fig. 18. Resultado de la amplificación del RNA del virus del dengue en <i>Ae. albopictus</i> de un pool positivo en la localidad de Mahuacates	48
Fig. 19. Resultado de la amplificación del RNA del virus del dengue cultivado en células C6/36 producto de un pool de mosquitos <i>Ae. albopictus</i> de la localidad Mahuacates	48
Fig. 20. Progreso de la infección viral registrado a varios tiempos en células C6/36 (40x, contraste de fases).....	50

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Condiciones de reacción para la retrotranscripción. Primera mezcla.	34
Tabla 2. Condiciones de reacción para la retrotranscripción. Segunda mezcla.	35
Tabla 3. Condiciones de reacción utilizadas para la identificación del virus dengue (PCR)	36
Tabla 4. Numero de <i>Aedes albopictus</i> y <i>Ae. aegypti</i> emergidos desde huevos a la etapa adulta obtenidos de ovitrampas colocadas en cinco sitios de muestreo de los municipios Guadalupe y Santiago, cerca de la ciudad de Monterrey (abril-octubre, 2010).	43
Tabla 5. Especies colectadas con aspirador de espalda además del género <i>Aedes</i>	45
Tabla 6. Numero de adultos <i>Ae. albopictus</i> y <i>Ae. aegypti</i> colectados con el aspirador de espalda en cinco sitios de muestreo de los municipios Guadalupe y Santiago, cerca de la ciudad de Monterrey (abril-octubre, 2010).	46
Tabla 7. Pools de hembras y machos <i>Ae. albopictus</i> y <i>Ae. aegypti</i> procesados para la búsqueda de RNA del virus dengue por RT-PCR en cinco sitios de muestreo de los municipios Guadalupe y Santiago, cerca de la ciudad de Monterrey (abril-octubre, 2010).	49

1. RESUMEN

El virus del dengue está distribuido en áreas tropicales y subtropicales en todo el mundo y es la causa del dengue clásico y dengue hemorrágico. En México *Ae. aegypti* es el vector reconocido del virus. Sin embargo, los vectores presentes en el estado de Nuevo León, son *Ae. aegypti* y *Ae. albopictus*. La incriminación de *Ae. albopictus* con el virus del dengue aún no ha sido evaluada en esta región del país. Por lo tanto, nuestro objetivo fue evaluar el papel de este vector en la transmisión del dengue en áreas suburbanas circundantes al área metropolitana de Monterrey. De abril a octubre del 2010, se colectaron huevos y adultos de la especie *Aedes* utilizando ovitrampas y un aspirador motorizado de espalda respectivamente. El estudio se llevó a cabo en cinco localidades de los municipios: Santiago y Guadalupe obteniendo un total de 1,836 adultos *Ae. albopictus* y 833 *Ae. aegypti* colectados mediante ambos métodos. Todos los mosquitos fueron separados en 144 pools y procesados por RT-PCR para detectar el genoma del DENV y a su vez mediante una PCR anidada se intentó tipificar el serotipo presente en las muestras. El examen para detectar RNA-DENV en las muestras mostró un pool positivo de cuatro hembras *Ae. albopictus* criadas desde huevos obtenidos de una zona suburbana en el municipio de Santiago. Sin embargo, no fue exitosa la determinación del serotipo de DENV esto, a pesar del éxito obtenido al cultivar en células C6/36 parte de la muestra del macerado de mosquitos y haber observado efecto citopático en las células. Esta investigación proporciona información que sugiere que la transmisión transovárica del virus del dengue en *Ae. albopictus* ocurre naturalmente en un sitio de estudio. Además el trabajo ofrece resultados importantes que cumplen con los criterios de incriminación de esta especie como vector comprobado del dengue.

2. ABSTRACT

Dengue virus is distributed in tropical and subtropical areas worldwide and is the cause of hemorrhagic dengue fever and dengue fever. In Mexico *Ae. aegypti* is the recognized vector of the virus. However, the vectors in the state of Nuevo Leon, are *Ae. aegypti* and *Ae. albopictus*. The incrimination of *Ae. albopictus* with dengue virus has not yet been evaluated in this region. Therefore, our objective was to evaluate the role of this vector in dengue transmission in suburban areas surrounding the metropolitan area of Monterrey. From April to October 2010, we collected *Aedes* mosquitoes using a motorized backpack aspirator and ovitraps in five localities of Guadalupe and Santiago, Nuevo Leon. A total of 1,836 *Ae. albopictus* and 833 *Ae. aegypti* mosquitoes were collected with both methods. Adults were separated into 144 pools and processed by RT-PCR to detect DENV genome. Then by a nested PCR was attempted to typify the serotype present in the samples. The test to detect DENV RNA in the samples showed a positive pool of four females *Ae. albopictus* reared from eggs obtained from a suburban area in the municipality of Santiago. However, it was not possible the determination of DENV serotype, despite the growing success in C6/36 cells in the sample of the mash for mosquitoes and the observation of cytopathic effect in cells.

This research provides information that suggests that transovarial transmission of dengue virus in *Ae. albopictus* occurs naturally in a study site. Further work provides important results that meet the criteria of this species incrimination as vector of dengue found.

3. INTRODUCCIÓN

El virus del dengue (DENV) es una de las enfermedades virales más importantes en el mundo transmitidas por mosquitos a los seres humanos. Aproximadamente 2.5 millones de personas corren el riesgo de infección (WHO, 2009). La enfermedad es causada por uno de los cuatro serotipos del virus del dengue (DENV1-4) relacionados entre ellos, pero antigénicamente diferentes (Gubler, 1988). El dengue se transmite principalmente por el mosquito *Aedes aegypti* no obstante, existen otras especies vectoras como *Ae. albopictus* (Skuse) y *Ae. polynesiensis* causantes de la enfermedad en otras partes del mundo (Hawley, 1988). En México *Ae. aegypti* es reconocido como el principal vector de esta enfermedad (Bancroft, 1906). Las primeras poblaciones de *Ae. albopictus* en el continente Americano fueron identificadas en 1986 en Texas (Sprenger, 1986; Moore *et al.*, 1988). Debido a la gran adaptabilidad de ésta especie poco tiempo después *Ae. albopictus* se había extendido a lo largo del territorio mexicano. Esta especie fue reportada en Coahuila y Veracruz (Martínez, 1995), Chiapas (Casas-Martínez *et al.*, 2003) y recientemente en la península de Yucatán (Salomón *et al.*, 2012). Por otra parte, el análisis de la ecología larval en Nuevo León y Coahuila ha mostrado una superposición de las especies *Ae. albopictus* con *Ae. aegypti* en el entorno del hogar (Rodríguez y Ortega, 1994, Orta *et al.*, 2001). La primera implicación de *Ae. albopictus* como vector del dengue ocurrió en Filipinas en los años veintes (Siler *et al.*, 1926). Posteriormente se informó que este vector tiene una alta susceptibilidad a la infección oral con los cuatro serotipos en comparación con *Ae. aegypti* (Rudnick y Chan, 1965). En cuanto a la transmisión vertical se ha demostrado que tiene lugar en la cámara genital de la hembra donde los huevos se fertilizan durante la oviposición (Rosen, 1988).

La importancia de la transmisión vertical del virus del dengue en la naturaleza permite determinar la forma de como éste se mantiene durante los periodos interepidémicos de la enfermedad. La transmisión transovárica ha sido demostrada experimentalmente en *Ae. albopictus* (Mitchell *et al.* 1990; Rosen *et al.* 1985, Rosen, 1988). Sin embargo, el papel de esta especie como un transmisor activo de DENV en el Nuevo Mundo no está bien documentado. Un gran número de *Ae. albopictus* han sido colectados en campo durante diferentes brotes de DENV los cuales revelan importantes evidencias de que esta especie puede contribuir en el ciclo de transmisión del virus. Sin embargo, el papel de esta especie en los brotes mencionados no fue evaluado. Hasta la fecha solo hay un hallazgo en las Américas en donde se reporta a *Ae. albopictus* infectado naturalmente en campo. Este reporte se dio en la ciudad de Reynosa, Tamaulipas, ciudad fronteriza con Texas. En este caso fue posible aislar DENV-2 y DENV-3 de diez mosquitos machos *Ae. albopictus* (Ibáñez-Bernal *et al.*, 1997). A pesar de que *Ae. aegypti* se reconoce como el principal vector en la zona noreste del país, las poblaciones presentes de *Ae. albopictus* se están expandiendo e invadiendo localidades suburbanas y rurales. Este estudio tuvo como objetivo determinar la importancia epidemiológica de poblaciones de *Ae. albopictus* en la transmisión del virus del dengue en lugares cercanos al área metropolitana de Monterrey.

4. HIPOTESIS

Aedes albopictus es un vector que mantiene y transmite horizontal y verticalmente el virus del dengue en los municipios de Guadalupe y Santiago, Nuevo León ocasionando casos focalizados de dengue en localidades suburbanas.

5. OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar la importancia epidemiológica del virus del dengue identificando su presencia, así como la transmisión horizontal y/o vertical del dengue en el vector *Ae. albopictus* procedente de cinco localidades suburbanas de dos municipios endémicos del estado de Nuevo León: Guadalupe y Santiago, Nuevo León.

5.2 OBJETIVOS PARTICULARES

1. Obtención de *Ae. albopictus* mediante los métodos de ovitrampas y aspirador motorizado de espalda.
2. Detectar la presencia del virus del Dengue en mosquitos hembras y machos colectados con aspirador motorizado de espalda en las localidades de Santiago y Guadalupe, N.L. mediante la técnica molecular de RT-PCR.
3. Detectar la presencia del virus del Dengue en moquitos machos y hembras emergidos de ovitrampas colocadas en Guadalupe y Santiago N.L., para establecer si ocurre la transmisión vertical, en ambos municipios.
4. Identificar el serotipo causante de los casos de dengue en las localidades de estudio mediante PCR anidada.

6. ANTECEDENTES

6.1 Historia epidemiológica del dengue

6.1.1 Dengue en el mundo

Los primeros brotes epidémicos, probablemente causados por dengue, documentados fueron en 1779 y 1790 en África, Asia y América del Norte. En la actualidad millones de personas viven en áreas de riesgo, donde se encuentran diferentes vectores que son capaces de transmitir el virus del dengue (Monath, 1994; Gubler, 1998).

En los últimos 50 años ha habido un incremento en el número de casos fatales por dengue en las regiones tropicales y subtropicales del mundo (Díaz, 2002). Esto coincide con el aumento demográfico y con el incremento de las zonas en las que los vectores del dengue pueden vivir. Por ejemplo, en 1979 se encontró la especie *Aedes albopictus* en Albania y para 1990 se reportó su presencia en 19 provincias de Italia (Knudsen, 1996). Actualmente, existe el riesgo que *Ae. albopictus* se distribuya en Europa en regiones donde la precipitación pluvial anual llega a 50 cm³, las temperaturas en el invierno no son menores de 0°C y en verano alcanzan los 20°C, y que incluye países como España, Portugal, Grecia, Turquía, Francia y partes de la República de Yugoslavia en países donde antes no se esperaba encontrarlo. Hasta el 2006, el área con riesgo de infección por el virus del dengue se había expandido a zonas como Nepal, Hong Kong, Madagascar, las islas Galápagos

y Hawaii (Fig. 1) (WHO, 2006). Además de que se han reportado brotes de FHD (fiebre hemorrágica del dengue) en Indonesia con 40,337 casos y más de 500 casos fatales en el año 2004 esto por mencionar algunos ejemplos (WHO, 2005).

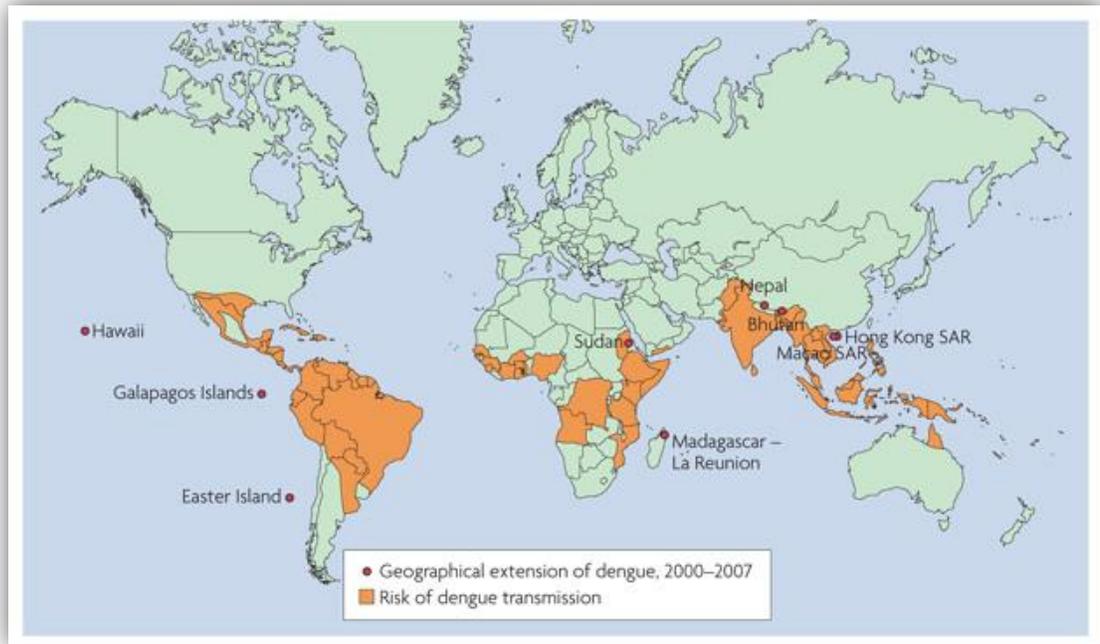


Fig. 1. Países y áreas de riesgo del dengue alrededor del mundo hasta el año 2007. Fuente: Guzmán *et al.*, 2010.

6.1.2 Dengue en el continente Americano

Desde hace 200 años se han documentado enfermedades con la sintomatología causada por el virus del dengue en América. La primera epidemia de dengue clásico fue reportada en Venezuela y la Cuenca del Caribe en los años 1963-1964, se reportó que la epidemia fue causada por el serotipo 3. Posteriormente otra epidemia afectó las Islas del Caribe en 1968 y de la cual fue posible aislar los serotipos 2 y 3. En el año 1977, Jamaica sufrió un brote causado por el serotipo 1 que también

afectó otras regiones como las Islas del Caribe, México, Centro y Sudamérica, reportándose un total de más de 700,000 casos (PAHO, 1979). A principio de los ochentas, el área afectada por el virus del dengue se expandió hasta los Estados Unidos de América (Nelson, 1986). El serotipo aislado fue el 1, el cual también fue responsable del gran brote en Cuba donde se documentaron más de 10 millones de enfermos, es decir, un 42% del total de la población (Kouri, 1989; Guzmán, 1984; Guzmán, 1990). Posteriormente, entre los años 1982 y 1989, se registraron brotes en América Sur, en países como Brasil, Bolivia, Paraguay, Ecuador y Perú que fueron causados por los serotipos 1 y 4 (Pinheiro, 1989). Los estudios inmunológicos revelaron que varios millones de personas se habían infectado y además se reportó un aumento drástico de los casos de dengue hemorrágico y síndrome de shock por dengue durante estas epidemias. Este patrón se observó en el brote de Cuba en 1981, que fue causado por el virus serotipo 2 y donde se reportaron 344,203 casos de dengue, que incluyeron 10,312 casos clasificados como dengue hemorrágico y 158 defunciones (Kourí, 1989; Guzmán, 1990). Como se mencionó anteriormente, la primera implicación de *Ae. albopictus* como vector del dengue ocurrió en Filipinas en los años veintes (Siler *et al.*, 1926). Recientemente se han dado casos importantes de dengue en diferentes partes del Continente Americano, por ejemplo en los años 2001-2002 en Hawaii se dio un brote. En este caso se pudo observar una mayor abundancia de *Ae. albopictus* que la de *Ae. aegypti* en el área donde se presenciaron los casos (Effler *et al.*, 2005). De forma similar ocurrió en Key West, Florida donde un brote autóctono de dengue ocurrió en el 2010, sin embargo se incriminó a *Ae. aegypti* como el causante del brote (MMWR, 2010) a pesar de que *Ae. albopictus* se encontraba presente en esta localidad (O'Meara *et al.*, 1993). En

ese mismo año 2010 ocurrió un brote en Puerto Rico del cual se reportaron 21,000 casos de dengue (CDC, 2011); y en donde frecuentemente fueron colectados en campo mosquitos *Ae. albopictus*. En todos los reportes anteriores se encontró presente esta especie, sin embargo en ninguno de los casos se realizaron estudios para determinar que vector se encontraba realmente transmitiendo el virus a las poblaciones humanas.

6.1.3 Dengue en México

De 1947 hasta la década de los sesentas, la Secretaría de Salud en México realizó intensivas campañas contra el vector transmisor del virus de dengue *Ae.aegypti*, y aunque el mosquito fue oficialmente declarado erradicado del país en 1963, dos años después fue detectado de nuevo en territorio mexicano (Gómez, 1992). La peor epidemia de la enfermedad producida por el serotipo 1 fue reportado en la costa oriental de México durante 1979-1980. Durante 1981, se registraron aproximadamente 17,000 casos (Díaz, 2002) y para 1984 y 1985 se diagnosticó dengue en 25 de los 32 estados del país. Actualmente se considera que la enfermedad, producto de la diseminación del vector, sigue en expansión principalmente debido a la urbanización de territorios nuevos (Briseño-García, 1996) además de la posible participación de otro vector como es el caso de *Ae. albopictus* (Sánchez *et al.*, 2011). *Ae. albopictus* fue encontrado infectado verticalmente con DENV, en Reynosa, Tamaulipas en 1995. Este ha sido el único reporte en las Américas de *Ae. albopictus* infectado naturalmente en campo. Los

autores de esta investigación pudieron aislar los serotipos 1 y 2 de diez mosquitos machos (Ibañez-Bernal *et al.* 1997). En Nuevo León, hasta la semana 29 del año 2010 se contaban con 430 casos confirmados de dengue, de los cuales el 98% fue confirmado como dengue clásico y el 2% como dengue hemorrágico de los cuales el serotipo presente fue el 1, mientras que en el año 2009 en el estado se encontraban presentes los serotipos 1 y 2. Así mismo pudo determinarse que en base a la población de Nuevo León el 50% de los casos se presentaron en edad productiva. Los municipios de Santiago y Guadalupe representaron cantidades importantes de casos hasta la semana 29 del 2010, ocupando Guadalupe el segundo lugar como municipio con mayor presencia de casos (Secretaría de Salud, 2010).

6.2 El vector *Ae. albopictus*

6.2.1. Posición taxonómica de *Aedes albopictus*

Ae. albopictus fue descrito por primera vez por Skuse en 1894 a partir de muestras obtenidas en Calcuta, India (Estrada y Craig, 1995). Según Huang, 1972; Estrada y Craig, 1995 la filogenia de la especie es como se muestra a continuación:

Orden: **Díptera**

Suborden: *Nematocera*

Familia: *Culicidae*

Genero: *Aedes*

Subgenero: *Stegomyia*

Grupo: *scutellarios*

Subgrupo: *albopictus*

6.2.2. Biología de *Ae. albopictus*

La biología de *Ae. albopictus* es comparable a la de *Ae. aegypti* siendo muy similares en su morfología de larva, pupa y adulto (Fig. 2), diferenciándose por la estructura de las escamas del octavo segmento abdominal y del pecten, así como por sus espículas latero torácicas cortas e hialinas en estado larvario y por los diseños de escamas plateadas, en cabeza y dorso de tórax para los adultos (SINAVE, 2005).



Fig. 2. Ciclo biológico de *Ae. albopictus*

Huevo

Aedes albopictus tiene un comportamiento similar a *Ae. aegypti*. La ovipostura de este mosquito es principalmente vespertina, similar a *Ae. aegypti*, además de que coloca sus huevos en las paredes de los recipientes y por encima del nivel del agua. Los huevos tienen forma alargada y generalmente miden menos de un milímetro de longitud (Linley, 1989; Hawley, 1988). Los huevos inicialmente son blancos, pero cambian su color a oscuro debido a la formación del embrión.; esto es porque al momento de la ovipostura, el embrión inicia su formación, para esto requiere de dos o tres días en presencia de gran humedad. El desarrollo embrionario generalmente se cumple a las 48 horas si el clima es favorable, de lo contrario puede tardar prolongarse hasta cinco días si las temperaturas son muy bajas (Nelson, 1986).

La máxima longevidad reportada para los huevos de *Ae. albopictus* es de 245 días (Hawley, 1988). Los huevos se ven afectados por diversos factores como la temperatura, la humedad relativa, la edad, entre otros, pero el agente determinante es la tensión de oxígeno del agua, la cual se encuentra asociado con la cantidad de materia orgánica y nutrientes presente en el agua (Imai y Meada, 1976; Hawley, 1988).

Larva

La larva de cuarto estadio presenta una antena larga y lisa, con una seta antenal simple, las setas 5, 6 y 7 pueden ser dobles, en el tórax presenta espinas laterales en el meso y metatórax cortas hialinas mientras que en *Ae. aegypti* son largas y oscuras. En el pecten del 8 segmento se presentan espinas largas con la base aserrada, mientras que en

Ae. aegypti las espinas del pecten presentan varias espinas subapicales cortas. En el 10° segmento, el cepillo ventral tiene cuatro pares de pelos, en *Ae. aegypti* presenta cinco pares de pelos o setas (CDC, 1986).

Los estadios larvales son de alimentación y crecimiento (Nelson, 1986). Las larvas de *Ae. albopictus* pueden desarrollarse bajo condiciones naturales en aguas con baja turbidez y un pH que va de 5.2 a 7.6 y con un rango de temperatura que va de los 14 a 30°C (Nelson, 1986).

El primer estadio larval es el que eclosiona del huevo, posteriormente a los dos días dependiendo de las condiciones ambientales ocurre una muda para pasar al segundo estadio en donde la cápsula cefálica y el sifón son transparentes y blandos, posteriormente ocurre una melanización y esclerotización las cuales permiten el coloramiento oscuro y endurecimiento de la larva. Después del segundo estadio, la cápsula cefálica y el sifón no cambian de tamaño, pero si el tórax y abdomen que van aumentando de longitud con cada muda (Nelson, 1986). La duración de los cuatro instar larvales depende de los factores ambientales y nutrimentales a los que las larvas están expuestas. Los principales factores extrínsecos que afectan el crecimiento y el desarrollo larval es la temperatura, la nutrición y la densidad larval, pero también la profundidad del recipiente así como la salinidad son importantes (Clements, 1992).

Pupa

La pupa no se alimenta, su función es dar paso a la metamorfosis del estadio larval al adulto. Bajo condiciones ideales el mosquito emerge en dos días. Después de la

emergencia del adulto, éste queda reposando sobre el agua en una fase conocida como periodo teneral el cual permite el endurecimiento del exoesqueleto y la rotación de la genitalia 180° en los machos (Nelson, 1986).

Adulto

Los adultos están cubiertos con delgadas escamas de color negro y con bandas. *Ae. albopictus* tiene mayor habilidad comparado con *Ae. aegypti* de colonizar criaderos naturales, como huecos de árbol, axilas de algunas plantas como bromelias (Fig. 3) y huecos de rocas; es común encontrarlo en lugares con vegetación abundante (Nelson, 1986).



Fig. 3. Tipo de criadero natural de *Ae. albopictus* en plantas

Una vez que los mosquitos han emergido, se alimentan por primera vez entre las 20 y las 72 horas posteriores. Las alimentaciones subsecuentes se efectúan aproximadamente cada tres días, con el objeto de completar su ciclo gonotrófico; antes de alimentarse buscan el sitio donde harán la oviposición. Regularmente se alimenta una sola vez entre cada ciclo gonotrófico. El lapso de oviposición es de tres a seis días. La supervivencia de

los mosquitos vectores en su fase adulta tiene un promedio entre cuatro y ocho semanas, aunque puede variar por circunstancias climatológicas; la hembra sobrevive más tiempo que el macho y es más resistente a las variaciones de temperatura y humedad ambiental (CENAVE, 2012).

6.2.3. Distribución geográfica de *Ae. albopictus*

Ae. albopictus se extiende a través del sur de Asia, Sureste de Guinea y en la mayoría de las islas del Océano Índico (Hawley, 1988). También se encuentra distribuido en el oriente de China, en el Pacífico y el sureste de Europa (Knudsen, 1996). Para 1990 se reportó la presencia y establecimiento de este vector en Australia al encontrarse larvas de esta especie (Kay *et al.*, 1990). *Ae. albopictus* es originario de Asia, sin embargo se fue extendiendo rápidamente en todos los continentes. Actualmente se encuentra establecida esta especie en el norte y sur de América, África, Oceanía y Europa (Rodhain, 1995) (Fig. 4).

Las primeras poblaciones de *Ae. albopictus* fueron identificadas en 1985 en Texas procedente de Asia (Sprenger, 1986; Moore *et al.*, 1988) siendo este el primer hallazgo de la especie en el Continente Americano. Un año después de su arribo, este mosquito ya había sido ampliamente distribuido en otros sitios de Texas, entre ellos Alabama, Arkansas, Georgia, Ohio por mencionar algunos (Moore, 1999). A su vez, ese mismo año la especie fue reportada en Brasil (Forattini, 1986; Moore, 1988). Actualmente la especie se encuentra ampliamente distribuida en los Estados Unidos, se han encontrado

y eliminado ejemplares de esta especie en California, Nuevo México y Washington (Moore, 1999).

Ae. albopictus fue rápidamente alcanzando las ciudades fronterizas de México con Estados Unidos. En México el primer reporte de esta especie fue en Matamoros, Tamaulipas de donde se colectaron larvas de *Ae. albopictus* en llantas (Moore, 1988), posteriormente en 1993 se localizó en Ciudad Acuña, Muzquiz y Piedras Negras en el estado Coahuila (Ibañez y Martínez 1994). En 1995, se realizó el primer reporte en América de infección natural por virus del dengue en la ciudad de Reynosa, Tamaulipas (Ibañez-Bernal *et al.*, 1995). En Veracruz la especie se reportó en 1997 (Casas y Torres, 2003). Nuevo León se ha reportado este mosquito en varias localidades entre ellas se encuentran Allende, Montemorelos, Linares, Terán y Santiago (los cuales se localizan en la llanura costera del Golfo de México); además se han reportado en Sabinas Hidalgo y Cadereyta; finalmente en el área metropolitana de Monterrey en los municipios de Apodaca, Guadalupe, San Nicolás de los Garza y Escobedo de los cuales Allende y Santiago fueron los que reportaron mayor densidad de población del vector (Orta *et al.*, 2005). Recientemente la especie se encontró en la península de Yucatán (Salomón *et al.*, 2012)

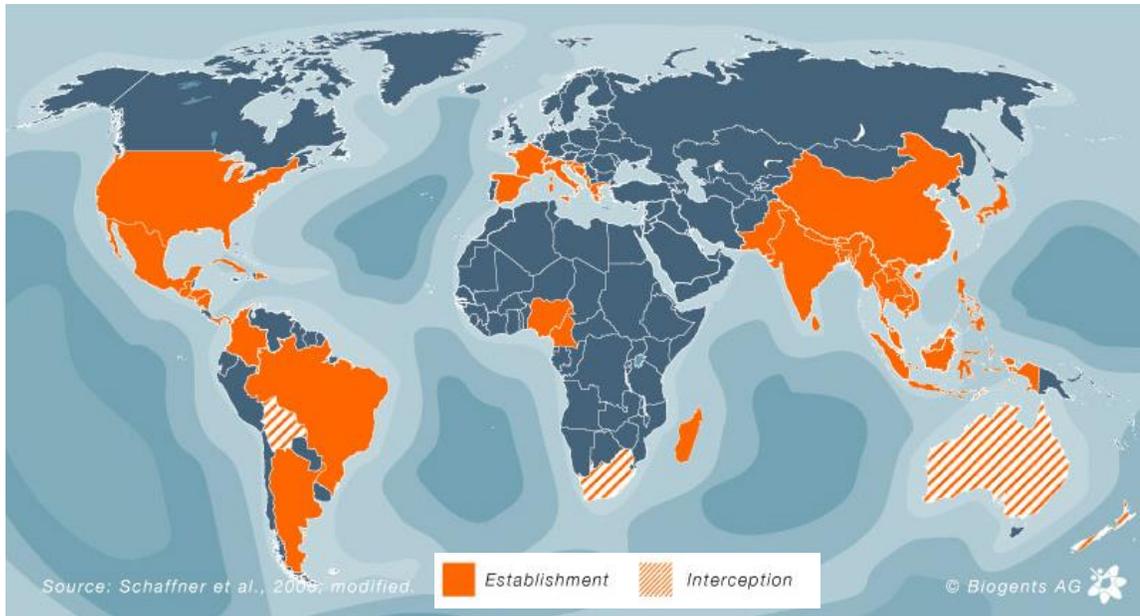


Fig. 4. Distribución mundial de *Ae. albopictus* hasta el año 2007

6.2.4. Rango de vuelo

Estudios previos han reportado que *Ae. albopictus* apenas puede desplazarse por sí solo poco más de 100 metros, pudiéndose capturar a una distancia máxima de 134 metros. Además de que no vuela cuando hay fuertes vientos y necesita de la ayuda humana permitir su expansión (Novak, 1992). Gracias a la venta de neumáticos usados, la comercialización de una planta ornamental, conocida como "bambú de la suerte" (*Dracaena* sp.), que llegó de China en pequeños recipientes con agua, entre otras situaciones específicas.

6.2.5. Hábitat de *Ae. albopictus*

Ae. albopictus es un mosquito con gran adaptabilidad a los mismos recipientes que sirven como sitios de cría de *Aedes aegypti* tanto en hábitats domésticos como

peridomésticos (OPS, 1987). De esta forma, esta especie es un mosquito de huecos de árboles, por lo que sus sitios de cría en la naturaleza son pequeñas áreas restringidas, a la sombra, rodeadas de agua y vegetación. *Ae. albopictus* habita en la densa vegetación de las zonas rurales. Sin embargo, su flexibilidad ecológica le permite colonizar muchos tipos de sitios creados por el hombre así como criaderos naturales. Se puede reproducir en macetas de flores de los cementerios, contenedores abandonados y cualquier otro envase que permita la acumulación de agua (Eritja *et al.* 2005). Los neumáticos son particularmente preferibles para la reproducción de este mosquito, ya que a menudo se almacenan al aire libre y que eficazmente almacenan y retienen el agua de lluvia durante mucho tiempo. Además la adición de hojas en descomposición de los árboles vecinos produce las condiciones químicas similares a los huecos de árboles, lo que proporciona un excelente sustrato para la cría. *Ae. albopictus* también se puede establecer y sobrevivir en zonas no urbanizadas que carecen de recipientes artificiales, la obtención de nuevos problemas de salud pública para las zonas rurales (Moore, 1999). Por otra parte, estudios previos han reportado que la mayor cantidad de depósitos positivos de *Ae. albopictus* se han encontrado en los exteriores de las viviendas (Marquetti *et al.* 2000; Ishak *et al.*, 1997).

6.2.6. Preferencia de hospederos

El mosquito tigre es un mosquito agresivo de día al aire libre. Cuenta con una gama muy amplia de huéspedes de ataque tales como: los seres humanos, animales de ganadería, anfibios, reptiles y aves (Eritja *et al.*, 2005). En Italia, una investigación permitió reportar de tasas de picadura de *Ae. albopictus* con un nivel de 30 a 48

picaduras de este mosquito afectando a diferentes hospederos (Cancrini *et al.*, 2003). Por otra parte, en Japón se realizó un estudio para determinar la capacidad vectorial de esta especie encontrando que *Ae. albopictus* muestra un patrón alto de preferencia por los mamíferos encontrándose el 84.2% de los adultos procesados con sangre animal y 68.5% mostraron el patrón de alimentación con sangre humana (Sawabe, *et al.*, 2010). Diversos estudios revelan constantemente la misma preferencia por estos hospederos y a pesar de que *Ae. albopictus* es una especie oportunista en cuanto a su alimentación. De esta manera en India se pudo constatar que tanto *Ae. aegypti* como *Ae. albopictus* se alimentan preferentemente de un solo hospedero, sin embargo un pequeño porcentaje de ambas especies reportaron haberse alimentado de más de un huésped durante el ciclo gonotrófico (Scott *et al.*, 1993). Al mismo tiempo, pudo determinarse que ambas especies tuvieron preferencia por la sangre humana al procesar mosquitos de áreas cercanas a viviendas (Tandon y Ray, 2000).

6.2.7. Importancia de *Ae. albopictus*

Los mosquitos son vectores de muchas enfermedades humanas relevantes. *Ae. albopictus* puede ser un motivo de especial preocupación como un vector para el virus del Nilo Occidental, ya que habita en zonas rurales y cuenta con una amplia gama de huéspedes, incluidas las aves, por lo que pueden pasar fácilmente a ciclos enzoóticos a los seres humanos. Se sabe que bajo condiciones de laboratorio *Ae. albopictus* puede infectarse con: cuatro Flavivirus, diez Bunyavirus y siete Alfavirus. Estos incluyen la fiebre amarilla, fiebre del Valle del Rift, chikungunya y Sindbis. De estos virus *Ae. albopictus* es principalmente conocido por infectarse en condiciones de campo a tres

Flavivirus tales como: dengue, virus del Oeste del Nilo y la encefalitis japonesa), seis Bunyavirus: virus del Cañón de Jamestown, Keystone, LaCrosse, Potosí, Valle de Cache y Tensaw) y un Alfavirus (CHIKV) (Enserink, 2008). El grado en que *Ae. albopictus* puede transmitir enfermedades en el mundo aún no está claro y depende de muchos factores, incluidos el tamaño de población, si se alimenta de humanos, si se alimenta de sangre de varias personas en el mismo ciclo y la eficacia del virus para llegar hasta las glándulas salivales. Se ha demostrado que *Ae. albopictus* tiene una ventaja competitiva con respecto a otras especies de mosquitos como *Ae. aegypti* (Lounibos, 2002; Vezzani y Carbajo, 2008). Sin embargo, *Ae. aegypti* es un vector más eficiente para la transmisión del virus en comparación con *Ae. albopictus*. Esto es debido en parte al rango de hospederos de *Ae. albopictus* y *Ae. aegypti* (Enserink, 2008). Estudios han revelado que *Ae. albopictus* tiene mayor susceptibilidad a la infección por dengue, sin embargo es menos eficiente a la transmisión al paso de las generaciones (Lambrechts *et al.*, 2010). Por otra parte, existen reportes que esta especie es capaz de transmitir transovaricamente el virus del dengue a su descendencia. En India se aisló el dengue serotipo 2 de mosquitos machos colectados en campo (Thenmozhi *et al.*, 2007). Particularmente en México en 1995 se encontraron machos infectados naturalmente en Reynosa, Tamaulipas siendo este el primer hallazgo de *Ae. albopictus* infectado transovaricamente con el virus del dengue en el continente Americano (Ibañez-Bernal *et al.*, 1995).

6.2.8. Identificación de adultos *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus*

Los adultos de las especies *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus* pueden ser fácilmente diferenciados por los patrones de escamas blancas en la parte dorsal del tórax (Fig. 5). En *Aedes aegypti*, el patrón está formado por dos líneas rectas rodeadas por unas líneas curvadas en forma de lira (Harwood y James, 1979; WHO, 1995). Por otra parte, *Aedes albopictus* tiene sólo una línea ancha de escamas blancas situada en el centro del tórax (WHO, 1995).



Fig. 5. Comparación de patrones del tórax entre *Ae. aegypti* (izquierda) y *Ae. albopictus* (derecha)

6.2.9. Virus del dengue

El virus del dengue es un virus envuelto, de cadena sencilla y sentido positivo. Consta de un genoma de alrededor de 11,000 bases que codifican para diez proteínas: tres proteínas estructurales (la glicoproteína de envoltura E, proteína de membrana M y proteína de la cápside); y siete no estructurales (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5); así como regiones cortas no codificantes en 5' y 3' (Fig. 6) (Chen *et al.*, 1999). Las

proteínas estructurales integran la cápsula viral y lanzan al RNA hacia las células diana. Mientras que las siete proteínas no estructurales coordinan la producción de nuevos virus una vez infectada la célula. El virus se encuentra envuelto en una membrana lipídica con 180 copias idénticas de una proteína estructural unidas a dicha membrana mediante un corto segmento de anclaje. La función de la proteína de la cápsula viral es unir el virus a la célula para dar comienzo al proceso de infección (Goodsell, 2008).

El virus del dengue pertenece a la familia *Flaviviridae* del cual se pueden distinguir 4 diferentes serotipos (DENV-1 a DENV-4) los cuales circulan simultáneamente en regiones tropicales y subtropicales en todo el mundo y son transmitidos a humanos por dos especies de mosquitos, *Aedes aegypti* (vector principal) y *Aedes albopictus*.

La infección con DENV en humanos produce un características específicas de la enfermedad que puede clasificarse en distintas categorías que van desde una infección asintomática o una enfermedad febril suave y autolimitada, conocida como dengue clásico o fiebre por dengue (DF), hasta una enfermedad severa como la fiebre hemorrágica del dengue (DHF), caracterizada por anormalidades en la hemostasia y un incremento de la permeabilidad vascular, que en algunos casos produce el Síndrome de shock por dengue (DSS, del inglés *dengue shock syndrome*), que puede llevar a la muerte (Gubler, 1998). La infección del hombre por un serotipo produce inmunidad permanente hacia el mismo tipo (inmunidad homóloga), mientras que la inmunidad heteróloga a otros serotipos es por un período menor de 6 meses (McBride y Bielefeldt, 2000; Fadilah *et al.*, 1999; Rosen, 1999).

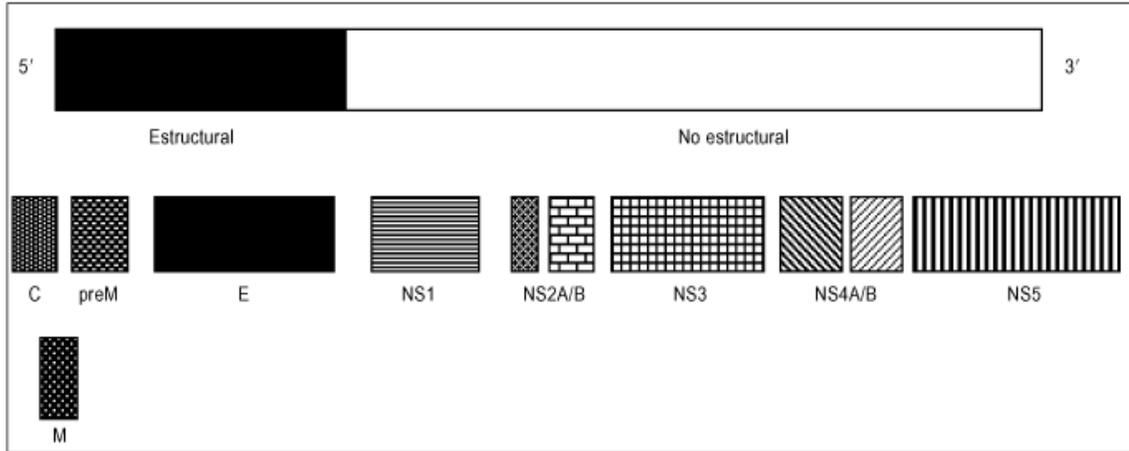


Fig. 6. Organización genómica del virus del dengue. El RNA genómico muestra las dos regiones no traducidas en los extremos 5' y 3' del genoma, codifica para tres proteínas estructurales (C, PrM, y E) y siete no estructurales (NS1-NS5).

7. MATERIAL Y MÉTODO

7.1. Áreas de estudio

El trabajo de campo se realizó entre el 30 abril hasta el 23 de octubre del 2010 en Santiago (entre 25°23'32 "N, 100 ° 07'28" O y 25°42'22 "N, 100 ° 19'12"O) y Guadalupe (25°38'21"N, 100°12,8 '64"O), cerca de los municipios del área metropolitana de Monterrey, México (Fig. 7). Las locaciones fueron elegidas en función a las altas densidades de mosquitos, la presencia de *Ae. albopictus* y en sitios donde se reportaron casos de dengue (Orta *et al.* 2005).



Fig. 7. Mapa del estado de Nuevo León representando los dos municipios de estudio: Guadalupe y Santiago.

Santiago se localiza al sur de Monterrey, capital de Nuevo León. Tiene una población de poco más de 40,000 personas (INEGI, 2010) y el 59% del suelo corresponde a las zonas boscosas, el 9% se dedica a la agricultura y sólo el 1% es zona urbana (Clave geoestadística, 2009a).

Guadalupe se encuentra a 20 km al norte de Santiago, que ocupa el 0.09% de la superficie de Nuevo León, con una población total de 678,006 habitantes (INEGI, 2010). En Guadalupe, el 50% del suelo corresponde a la zona urbana, el 1% se dedica a la agricultura, el 36% corresponde a bosques y matorrales y el 1% para el pastoreo (Clave geoestadística, 2009b). Cuatro puntos de muestreo fueron seleccionados en Santiago los cuales fueron: Antonio Villalón (25°42'22"N, 100°19'12" O), que es una zona residencial suburbana, también una zona turística que comprende un área de restaurantes (25°24'23"N, 100°08'39"O), el cual cuenta con todas las características necesarias para la actividad de picadura, la localidad de Mahuacates (25°29'43"N, 100°11'09"O) que corresponde a un área de viviendas con asentamientos irregulares, y el cementerio de San Marcos (25°23'32"N, 100°07'28"O). Sólo Rincón de la Sierra (25°38'21"N, 100°12,8'64"O), una zona residencial el cual se encuentra en áreas boscosas, fue seleccionado en el municipio de Guadalupe. El dengue es una enfermedad endémica en ambos municipios, sin embargo Guadalupe siempre reporta un mayor número de casos. En 2012, Guadalupe registró 305 casos por dengue clásico (DC) y 43 por dengue hemorrágico (DH), mientras que Santiago informó de 21 de DC y 2 de DH (Laboratorio Estatal de Salud, Nuevo León).

7.2. Colecta de huevos con ovitrampas

Ovitrampas de plástico negro estandarizadas de 500 ml fueron utilizadas para obtener huevos de *Ae. albopictus* (Fig. 8). A cada ovitrampa se le agregaron dos terceras partes de agua y en la parte superior interna de cada una se colocó una tira de papel filtro.



Fig. 8. Representación gráfica de las ovitrampas

Cien ovitrampas fueron situadas en cada uno de los siguientes puntos: Antonio Villalón, cementerio San Marco, Mahuacates, y Rincón de la Sierra, sólo en el área turística de alimentos se situaron 20 ovitrampas. Lugares sombreados en los patios de las casas, en los árboles del cementerio, manchas de vegetación, macetas y jardines fueron utilizados para colocar las ovitrampas por punto de colecta. Después de cinco días, estos criaderos artificiales fueron retirados de los sitios de colocación y transportados al

Laboratorio de Entomología médica para ser observados y reportar la actividad de oviposición de los mosquitos *Aedes* (Fig. 9). El papel filtro de cada ovitrampa fue retirado y transportado al insectario del Laboratorio de Entomología Médica de la Universidad de Nuevo León para la eclosión de los huevos y la cría de los mosquitos adultos.



Fig. 9. Arribo de ovitrampas al laboratorio para la cuantificación de oviposición

7.3. Cría de mosquitos procedentes de ovitrampas

La cría y establecimiento de la colonia fue llevada a cabo bajo las técnicas establecidas de cría en insectario (Pérez *et. al.*, 2004). Los huevos obtenidos fueron colocados en charolas de 25x 25 cm² con 2 litros de agua declorada a una temperatura de 28-30°C. Posterior al 3er día se proporcionó una dieta alta en proteína (UCS, 1982) siguiendo las normas establecidas por Consoli y De Oliveira (1994). Las pupas fueron retiradas de las charolas y colocadas en cámaras de emergencia hasta su estadio adulto. Posteriormente éstos fueron identificados sobre una mesa de enfriamiento (BioQuip)

(Fig. 10) para evitar la degradación de ácidos nucleicos presentes en los ejemplares, además se contó con el apoyo de un estereoscopio y las claves taxonómicas propuestas por Darsie y Ward (2005).



Fig. 10. Mesa de enfriamiento de apoyo para identificar especies de mosquitos

Los mosquitos adultos fueron separados en lotes o pools con un máximo de 25 mosquitos de acuerdo a: especie, sexo, lugar y fecha de colecta. Los pools fueron almacenados a -80°C (Fig. 11) hasta el procesamiento para la identificación molecular de RNA-DENV en cada muestra .



Fig. 11. Pools de mosquitos almacenados a -80°C

7.4. Colecta de mosquitos adultos con aspirador de espalda

Con la finalidad de coleccionar mosquitos *Ae. albopictus* en reposo se utilizó el aspirador motorizado de espalda (Fig. 12) (Clark y Gubler, 1994). El muestreo se llevó a cabo en sitios al aire libre cerca del medio ambiente peridoméstico debido a las preferencias del vector, esto en los cinco sitios de estudio. Áreas de reposo documentadas tales como la vegetación y otros puntos naturales fueron el objetivo debido a la biología de esta especie (Hawley, 1988). Los mosquitos adultos fueron transportados en CO₂ sólido al Laboratorio de Entomología Médica de la Universidad de Nuevo León, México. Luego, sobre una mesa de enfriamiento (BioQuip) se identificaron utilizando claves taxonómicas (Darsie y Ward 2005) y separados en grupos por: especie, sexo, localización y fecha de colecta de la fecha. Los pools o lotes tuvieron un máximo de 25 mosquitos y éstos también fueron almacenados a -80°C hasta la identificación molecular de RNA-DENV.



Fig. 12. Colecta de mosquitos con aspirador de espalda

7.5. Identificación molecular de DENV a partir de adultos provenientes de ovitrampas y adultos en reposo de *Ae. albopictus* y *Ae. aegypti*

7.5.1. Macerado de mosquitos

Los pools de las especies *Aedes* fueron procesados para la identificación de DENV por la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR). Los mosquitos agrupados en *pools* se trituraron en frío en tubos Eppendorf utilizando el TissueRuptor (Fig. 13) y 0.6 ml de frío medio esencial mínimo (MEM) (GIBCO) que contenía 2% de suero fetal bovino (FBS) (GIBCO). La suspensión resultante se añadió a una columna QIAshredder (QIAGEN), y fue centrifugada a 14,000 rpm durante 3 minutos a 4°C. Finalmente, el sobrenadante fue separado en dos tubos Eppendorf de 300µl para el proceso de extracción de RNA y las suspensiones restantes fueron almacenadas a -80°C.

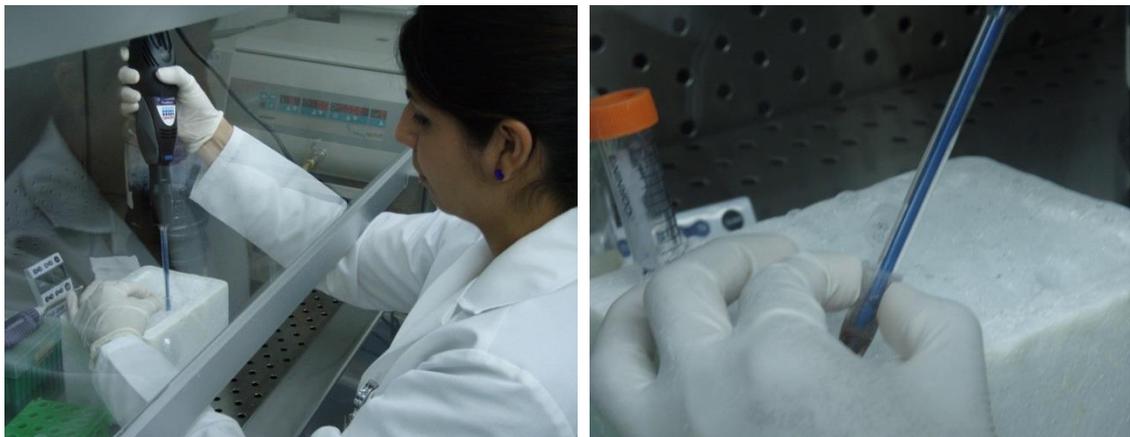


Fig. 13. Procedimiento realizado en campana de flujo laminar para la maceración de mosquitos utilizando el TissueRuptor

7.5.2. Extracción de RNA

El RNA total fue extraído utilizando el kit RNeasy (QIAGEN) (Fig. 14).



Fig. 14. Reactivos y columnas del Kit comercial QIAshredder y RNeasy para la extracción de RNA total.

Se añadieron 300 μ l de buffer RLT con β -Mercaptenol a los 300 μ l del filtrado obtenido en la maceración de mosquitos y posteriormente se agregaron 350 μ l de etanol y fueron mezclados por pipeteo. Esta solución fue transferida a una mini columna RNeasy y en el equipo Biofuge se centrifugó a 10,000 rpm durante 1 minuto a 4°C (Fig. 15) y el filtrado fue desechado. Posteriormente se añadieron 700 μ l de buffer RW1a la columna y se centrifugó a 10,000rpm durante 1 minuto a 4°C desechando el tubo colector con el filtrado. Finalmente, la columna fue transferida a un nuevo tubo colector a la cual se le añadieron 500 μ l de buffer RPE y fue centrifugada a 10,000rpm por 2 minutos a 4°C eliminando el filtrado con el tubo colector. Para el proceso de elución de la muestra la columna fue transferida a un nuevo tubo colector (Eppendorf de 1.5ml) y se agregaron 50 μ L de agua libre de RNAsas, siendo centrifugado a 10,000rpm durante 1 minuto. Finalmente el extracto fue almacenado hasta su procesamiento molecular.



Fig. 15. Biofuge para el proceso de centrifugación de muestras en frío

7.6. Detección de RNA viral

7.6.1. Retrotranscripción

La RT-PCR se realizó para detectar la presencia del virus y los serotipos en los pools de mosquitos. Para obtener un fragmento específico que permitiera la identificación de DENV, se utilizaron cebadores iniciales D1 e inversos D2 que cubren una región de genes de la cápside (C) y la premembrana (prM) de los cuatro serotipos de DENV. El tamaño esperado de la banda de PCR fue de 511 pb, el cual indica la presencia del virus en las muestras.

La preparación de reactivos para la realización de Retrotranscripción y posterior amplificación del cDNA se realizó en el interior de una campana con las condiciones de esterilidad correspondientes (Fig. 16).

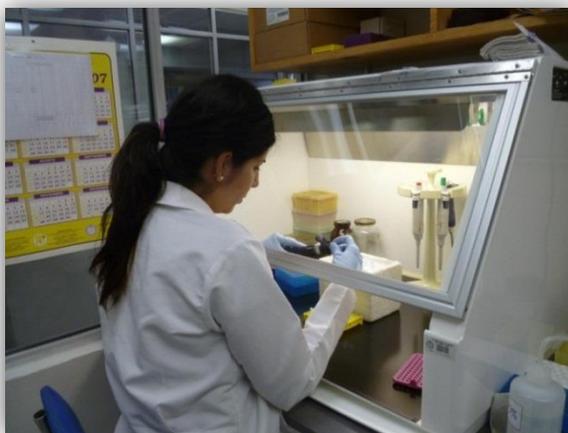


Fig. 16. Preparación de reactivo para RT-PCR

La reacción de RT fue realizada de un solo paso y en un solo tubo adicionando secuencialmente los siguientes reactivos:

Tabla 1. Condiciones de reacción para la retrotranscripción. Primera mezcla.

Reactivo	Volumen μl
H₂O DEPC	5.5
Random primer	1
RNA	5
<i>Volumen total</i>	11.5

Al ser preparada la mezcla uno se coloca en el termociclador a 72°C durante 10 minutos. Posterior a este tiempo se incuban los tubos con reactivos y muestras y 3

minutos en hielo. Al mismo tiempo la siguiente mezcla fue preparada para ser adicionada a la mezcla uno después transcurrido el tiempo de incubación.

Tabla 2. Condiciones de reacción para la retrotranscripción. Segunda mezcla.

Reactivo	Volumen μl
Buffer RT 5X	4
DTT (0.1M)	2
RNase out 40U/ μ l	0.5
dNTP's	1
Enzima M-MLV 200U/ μ l	1
<i>Volumen total</i>	8.5

A cada tubo incubado con el mix 1 se le añadieron 8.5 μ l correspondientes del mix 2. Los tubos adquirieron un volumen final de 20 μ l para la realización de la retrotranscripción. Finalmente fueron colocados en el termociclador para seguir una programación con diferentes temperaturas 25°C durante 10 minutos, 37°C durante 60 minutos, 94°C por 5 minutos y finalmente 4°C, 30 minutos (Lanciotti *et al.* 1992).

7.6.2. Serotipificación del dengue

Para la identificación y serotipificación del virus del dengue en las muestras se utilizó el protocolo establecido por Lanciotti (1992). Este procedimiento consiste en una

retrotranscripción seguida de una amplificación del cDNA para la obtención de regiones de tamaño diferente para realizar una identificación diferencial por peso según el serotipo del dengue presente.

Para la realización de la PCR posterior a la RT se utilizaron los siguientes reactivos:

Tabla 3. Condiciones de reacción utilizadas para la identificación del virus dengue (PCR)

Reactivo	Concentración final	Volumen μL
Agua miliQ	--	12.75
Buffer (500mM, KCl 1000mM Tris-HCl, pH= 8	1X	2.5
MgCl ₂	50mM	1.5
dNTP's mix	0.2mM	0.5
D1	0.5 μm	1.25
D2	0.5 μm	1.25
TaqDNA pol	2.5 U	0.25
	Volumen reactivos	20
cDNA	--	5
	<i>Volumen total</i>	25

El volumen final de reacción fue de 25 μl , y las muestras se realizaron en un termociclador en un curso inicial de cinco minutos a 94°C, 40 ciclos de 1 minuto a 94°C, 60°C durante un minuto y un ciclo de extensión final de 72° C durante 10 minutos (Lanciotti *et al.* 1992).

Cada muestra fue a su vez corrida con cuatro cepas correspondientes a cepas de referencia como controles positivos de DENV1-DENV4 proporcionados por el Centro

Regional de Investigación "Dr. Hideyo Noguchi", Yucatán, México. Para DENV-1 la cepa corresponde a: H15911P5, DENV-2: H17247P4, DENV-3: H87, y DENV-4: H241. Además se contó con un control negativo el cual consistió en los reactivos utilizados para la PCR, así como el marcador molecular ØX174, HaeIII Digest (Biolabs).

Secuencias de los cebadores utilizados:

D1 5'-TCAATATGCTGAAACGCGCGAGAAACCG-3'

D2 5'-TTGCACCAACAGTCAATGTCTTCAGGTTC-3'

Los productos de amplificación se sometieron a electroforesis en un gel de agarosa al 1.5% con bromuro de etidio. La interpretación de resultados de los geles fueron de la siguiente manera:

En la RT-PCR las muestras fueron comparadas con el marcador molecular para cotejar el tamaño de las bandas en las muestras. Las muestras fueron consideradas positivas al virus del dengue al observarse de una banda de 511 pb bajo luz ultravioleta; la muestra se consideró negativa al no presentar esta banda específica (Lanciotti *et al.*, 1992).

Al encontrar una muestra positiva se realizó una PCR anidada para determinar el serotipo presente en la muestra.

7.6.3. Determinación de serotipos virales por medio de PCR anidada

Para la identificación del serotipo del virus del dengue en los pools detectados como positivos, se realizó una PCR anidada. Para esto se utilizaron los cebadores D1 y serotipo-específicos antisentido (TS1, TS2, TS3 y TS4) reportados por Lanciotti (1992). Estos primers permiten amplificar diferentes tamaños del genoma del virus según el serotipo de los cuales para DENV-1 el tamaño de la banda esperada fue de 482 pb, para DENV-2: 392 pb, DENV-3: 290 pb y DENV-4: 119 pb.

Las secuencias de los cebadores utilizados fueron:

D1 5'-TCAATATGCTGAAACGCGCGAGAAACCG-3'

TS1 5'-CGTCTCAGTGATCCGGGGG-3'

TS2 5'-CGCCACAAGGGCCATGAACAG-3'

TS3 5'-TAACATCATCATGAGACAGAGC-3'

TS4 5'-CTCTGTTGTCTTAAACAAGAGA-3'

7.6.4. Análisis de los productos de PCR por electroforesis

Se prepararon geles de agarosa al 1.5% para la visualización de bandas de los productos amplificados en la PCR. Para esto se agregaron 0.6g de agarosa en 40 ml de TBE 1X (0.4M de Tris, 0.5 M de ácido bórico y 0.01 M de ácido etilendiamín tetracético), teñido con bromuro de etidio. A 10µl del producto amplificado se le adicionaron 2µl del tampón de corrida y se sometió a electroforesis en el gel de agarosa en una cámara submarina para electroforesis (Owl) (Fig. 17) utilizando para ello como tampón de corrida TBE 1X. Las muestras fueron corridas a 70 V, durante 50 minutos. Al

finalizar, las bandas del ADN amplificado fueron visualizadas mediante un transiluminador de luz UV, comparando las bandas obtenidas con un marcador de peso molecular.



Fig. 17. Cámara electroforética utilizada y colocación de muestras en gel de agarosa

7.6.5. Aislamiento viral en células C6/36 a partir de macerado de mosquitos

La línea celular C6/36 (Igarashi, 1978) es una clona obtenida de la línea original de *Ae. albopictus* establecida por Singh y Pavri (1967) que presenta una alta sensibilidad a los virus del dengue (Gubler *et al.*, 1985). Algunas cepas de dengue son capaces de producir efecto citopático de tipo sincicial en las C6/36. Con mucha frecuencia se observa toxicidad en las células a causa de los inóculos empleados (IMT, 2003).

Se cultivaron células C6/36 en una botella de 25 cm² a 28°C sin atmósfera de CO₂, hasta formar una monocapa confluyente. Para infectar las células, el medio de cultivo se reemplazó con 2 ml de medio de mantenimiento (L-15 suplementado con SBF al 2% en

lugar del 5%). Cincuenta microlitros del macerado de mosquito se adicionaron a la botella de cultivo y se incubaron durante una hora a 37°C.

La botella fue incubada a 28°C sin atmósfera de CO₂ durante 15 días, durante este periodo se revisaron los posibles cambios en la morfología celular cada dos días. Después de 15 días post-infección se realizó la cosecha de las células por raspado mecánico. La suspensión viral obtenida se procesó a 4°C y se dividió en alícuotas de 250 µL en una proporción 80:20 suspensión celular/mezcla de congelación. La mezcla de congelación empleada se preparó en una proporción 90:10 suero bovino fetal/ NaHCO₃ al 7.5%. Las muestras fueron almacenadas a -80°C.

7.7. Análisis estadístico

Un Análisis de varianza (ANOVA) se utilizó para calcular si la presencia de los mosquitos *Aedes* por el método de ovitrampas y aspirador motorizado de espalda fueron estadísticamente diferentes en las 5 localidades (Zar 1999). Además una prueba de Tukey se utilizó para comparar pares de medias aritméticas entre las localidades y números de *Ae. albopictus* / *Ae. aegypti* usando el software SPSS (SPSS 19.0, SPSS Inc., Chicago, Il.).

8. RESULTADOS

8.1. Colecta de huevos con ovitrampas

En total fueron colocadas 420 ovitrampas en las cinco localidades muestreadas, aunque sólo 409 (97.4%) fueron recuperadas. Después de cinco días de permanecer las ovitrampas en cada punto de colocación se obtuvieron 358 (87.5%) ovitrampas positivas. En Guadalupe, en la localidad de Rincón de la Sierra se encontró la mayor positividad de ovitrampas (99%) y en la localidad Antonio Villalón el menor número de huevos ovipuestos (77.6%) de los cinco sitios de estudio. (Tabla 4). El análisis ANOVA mostró diferencias significativas entre las cinco localidades de la presencia de los mosquitos *Aedes* ($F = 5,953$, gl 4, $p < 0.001$). En total se obtuvieron 18,571 huevos de ovitrampas en las cinco localidades. En Rincón de la Sierra se reportó la tasa más alta de la oviposición (8,551 huevos), seguido de Mahuacates con 6,128 huevos de *Aedes* sp. De las 358 ovitrampas positivas sólo 1,965 (10.6%) de los huevos llegaron a la etapa adulta. Mahuacates fue la localidad que tuvo la mejor tasa de eclosión con 593 (30.2%) adultos y la zona de más baja tasa fue el área de alimentos (restaurantes) la cual presentó 60 (3.1%) adultos emergidos. En total 1,280 (65.1%) huevos fueron los emergidos como adultos *Ae. albopictus* de los cuales: 698 (35.5%) fueron hembras y 582 (29.6%) machos. En Mahuacates se encontró la mayor frecuencia de *Ae. albopictus*, con 586 (29.8%) adultos, de estos comprendieron 323 (16.4%) hembras y 263 (13.4%) machos. En Antonio Villalón reportamos la menor presencia *Ae. albopictus* con 16 (0.8%) adultos, de los cuales 14 (0.7%) fueron hembras y 2 (0.1%) machos. Por otro lado, *Ae.*

aegypti representó el 34.9% de los mosquitos totales emergidos. La localidad en la que se obtuvo mayor número de mosquitos de esta especie fue Antonio Villalón, con 301 (15.3%) adultos, mientras que en Mahuacates encontramos las cifras de población más bajas, con 7 (0.3%) adultos, incluyendo ambos sexos. De 685 adultos totales *Ae. aegypti*, 320 (16.3%) fueron hembras y 365 (18.6%) machos. Se encontró que la localidad de Antonio Villalón tuvo los números más altos de hembras con 143 (7.3%) adultos y 158 (8%) machos. Por otra parte, se observó una interesante superposición de *Ae. albopictus* y *Ae. aegypti* la cual se registró en las cinco localidades. Se encontró la coincidencia de ambas especies en 31 (8.7%) de 358 ovitrampas positivas. En Rincón de la Sierra obtuvimos los números más altos de ovitrampas con solapamiento de especies, encontrando esto en 16 (4.5%) de ellas. En general, las ovitrampas tuvieron un éxito mayor para obtener más *Ae. albopictus* (65.1%) que *Ae. aegypti* (34.9%). La proporción de adultos emergidos fue muy cercana entre ambos sexos, es decir, 1,018 (51.8%) hembras y 947 (48.2%) machos.

Tabla 4. Numero de *Aedes albopictus* y *Ae. aegypti* emergidos desde huevos a la etapa adulta obtenidos de ovitrampas colocadas en cinco sitios de muestreo de los municipios Guadalupe y Santiago, cerca de la ciudad de Monterrey (abril-octubre, 2010).

Localidad	Ovitrampas colocadas (n)	Positivas a huevos n (%)	Numero de huevos ovipuestos	Adultos emergidos n (%)	<i>Ae. albopictus</i>			<i>Ae. aegypti</i>			Superposición de <i>Ae. albopictus</i> y <i>Ae. aegypti</i>	
					hembras n (%)	machos n (%)	Total n (%)	hembras n (%)	machos n (%)	Total n (%)	Ovitrampas positivas n (%)	Adultos <i>Aedes</i> n (%)
Antonio Villalón	98	76 (77.6)	1,104	317 (16.1)	14 (0.7)	2 (0.1)	16 (0.8)	143 (7.3)	158 (8)	301 (15.3)	2 (0.6)	5 (0.3)
Área Restaurantes	20	18 (90)	147	60 (3.1)	15 (0.8)	12 (0.6)	27 (1.4)	16 (0.8)	17 (0.9)	33 (1.7)	1 (0.3)	7 (0.4)
Panteón S. Marco	93	80 (86)	2,641	559 (28.4)	196 (10)	150 (7.6)	346 (17.6)	98 (5)	115 (5.9)	213 (10.9)	11 (3)	141 (7.1)
Mahuacates	98	85 (86.7)	6,128	593 (30.2)	323 (16.4)	263 (13.4)	586 (29.8)	3 (0.1)	4 (0.2)	7 (0.3)	1 (0.3)	3 (0.2)
Rincón de la Sierra	100	99 (99)	8,551	436 (22.2)	150 (7.6)	155 (7.9)	305 (15.5)	60 (3.1)	71 (3.6)	131 (6.7)	16 (4.5)	340 (17.2)
Total	409	358 (87.5)	18,571	1,965 (100)	698 (35.5)	582 (29.6)	1,280 (65.1)	320 (16.3)	365 (18.6)	685 (34.9)	31 (8.7)	496 (25.2)

8.2. Colecta de mosquitos adultos con aspirador de espalda

Un total de 704 *Ae. albopictus* y *Ae. aegypti* fueron obtenidos mediante el aspirador motorizado de espalda, correspondiendo a 472 (67%) hembras y 232 (33%) machos (Tabla 5). Ambas especies estuvieron presentes compartiendo áreas peridomesticas, en las cinco localidades de estudio. Sin embargo, en Mahuacates fueron capturados los números más altos de mosquitos *Aedes* 309 (43.9%), mientras que en el área de alimentos (restaurantes) fueron capturados sólo 20 (2.8%) adultos. Del total de mosquitos colectados se identificaron como *Ae. albopictus* 556 (79%) mosquitos de los cuales 405 (57.5%) fueron hembras y 151 (21.5%) machos. Mahuacates mostró los números más altos de *Ae. albopictus*, con 279 (39.6%) adultos, que comprendieron 226 (32.1%) hembras y 53 (7.5%) machos. Rincón de la Sierra registró 225 (32%) de *Ae. albopictus*, con 147 (20.9%) hembras y 78 (11.1%) machos. En el área de alimentos (restaurantes) no se encontró presencia de esta especie. El total de adultos de *Ae. aegypti* obtenidos con el aspirador de espalda fue de 148 (21%) que correspondieron a 67 (9.5%) hembras y 81 (11.5%) machos. Rincón de la Sierra reportó la mayor abundancia de *Ae. aegypti* 48 (6.8%), mientras que en el área de alimentos se encontraron sólo 20 (2.8%) mosquitos. En Rincón de la Sierra se encontraron más hembras *Ae. aegypti* 30 (4.3%), mientras que en Antonio Villalón se reportó una mayor cantidad de machos con 25 (3.6%) *Ae. aegypti* (Tabla 2). Los resultados mostraron que el aspirador de espalda tuvo mayor eficacia al coleccionar 556 (79%) *Ae. albopictus* que 148 (21%) *Ae. aegypti* en las cinco localidades. Del mismo modo, se pudo notar que el aspirador de espalda capturó más hembras *Aedes* (67%) que machos (33%). Sin embargo, los resultados de las

ovitrampas en este estudio indicaron que éstas son un mejor método que el aspirador de espalda para obtener *Ae. albopictus* y *Aedes aegypti* en los sitios de estudio.

Además se lograron coleccionar con aspirador de espalda las siguientes especies diferentes al género *Aedes*:

Tabla 5. Especies coleccionadas con aspirador de espalda además del género *Aedes*

Municipio	<i>Culex sp.</i>	<i>Toxorhynchites sp.</i>	<i>Apis mellifera</i>	<i>Drosophila sp.</i>	<i>Chironomus sp.</i>
Guadalupe	30	3	2	1	4
Santiago	45	7	0	1	0

Tabla 6. Numero de adultos *Ae. albopictus* y *Ae. aegypti* colectados con el aspirador de espalda en cinco sitios de muestreo de los municipios Guadalupe y Santiago, cerca de la ciudad de Monterrey (abril-octubre, 2010).

Localidad	<i>Ae. albopictus</i> + <i>Ae. aegypti</i>			<i>Ae. albopictus</i>			<i>Ae. aegypti</i>		
	hembras n (%)	machos n (%)	Total n (%)	hembras n (%)	machos n (%)	Total n (%)	hembras n (%)	machos n (%)	Total n (%)
Antonio Villalón	1 (0.1)	26 (3.7)	27 (3.8)	1 (0.1)	1 (0.2)	2 (0.3)	0	25 (3.6)	25 (3.6)
Área de Restaurantes	10 (1.4)	10 (1.4)	20 (2.8)	0	0	0	10 (1.4)	10 (1.4)	20 (2.8)
Panteón San Marco	37 (5.3)	38 (5.4)	75 (10.7)	31 (4.4)	19 (2.7)	50 (7.1)	6 (0.8)	19 (2.7)	25 (3.6)
Mahuacates	247 (35.1)	62 (8.8)	309 (43.9)	226 (32.1)	53 (7.5)	279 (39.6)	21 (3)	9 (1.2)	30 (4.2)
R. de la Sierra	177 (25.1)	96 (13.7)	273 (38.8)	147 (20.9)	78(11.1)	225 (32)	30 (4.3)	18 (2.6)	48 (6.8)
Total	472 (67)	232 (33)	704 (100)	405 (57.5)	151 (21.5)	556 (79)	67 (9.5)	81 (11.5)	148 (21)

8.3. Detección de virus del dengue por RT-PCR

Un total de 144 pools de mosquitos *Aedes* fueron procesados mediante RT-PCR. El rango de mosquitos varió de 1 a 25 adultos por pool. Se obtuvieron 68 pools de adultos *Ae. albopictus* emergidos de ovitrampas y 35 de adultos capturados con el aspirador de espalda. En cuanto a los pools de *Ae. aegypti* se obtuvieron 32 provenientes de ovitrampas y 9 del aspirador de espalda. Sólo un pool de 4 hembras *Ae. albopictus* criadas desde huevo al estado adulto obtenido en la localidad de Mahuacates fue detectado como positivo para la presencia de DENV por RT-PCR (Tabla 6). El hallazgo encontrado en esta investigación acerca de la transmisión transovárica de DENV permitió documentarse para *Ae. albopictus* en esta región del noreste de México. El producto de amplificación de DENV-RNA mostró una banda de 511 pb (Figura 18) utilizando los primers D1 (forward) y D2 (reverse). Sin embargo, con los primers específicos de tipo utilizados en esta investigación no fue posible determinar el serotipo presente en la muestra positiva a DENV. A su vez, con la finalidad de comprobar el resultado obtenido se corrieron nuevamente dos veces más el pool positivo con el macerado de mosquitos. El proceso incluyó desde la extracción de RNA hasta la identificación del serotipo presente en la muestra. Nuevamente, se observó la banda correspondiente a 511 pb, específica de dengue. Sin embargo, no fue posible identificar el serotipo. Por otra parte, en cultivo celular también se observó la banda correspondiente a dengue pero tampoco se logró identificar el serotipo (Fig. 19).

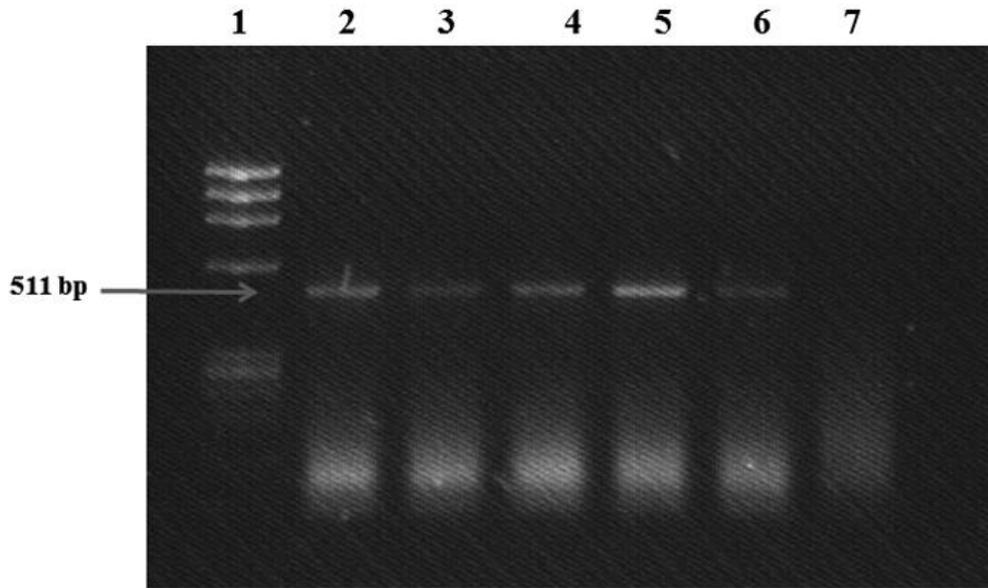


Fig. 18. Resultado de la amplificación del RNA del virus del dengue en *Ae. albopictus* de un pool positivo en la localidad de Mahuacates, Santiago, NL. Carril 1: marcador molecular ØX174 (pb), Carriles 2-5: Controles de referencia positivos DENV1-DENV4, Carril 6: amplificación de RNA de dengue virus en *Ae. albopictus* de una ovitrampa, Carril 7: control negativo (reactivos PCR).

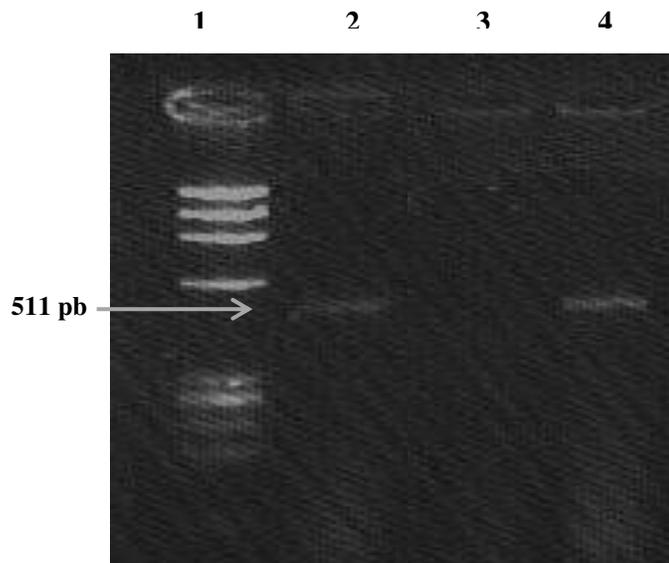


Fig. 19. Resultado de la amplificación del RNA del virus del dengue cultivado en células C6/36 producto de un pool de mosquitos *Ae. albopictus* de la localidad Mahuacates, Santiago, NL. Carril 1: marcador molecular ØX174 (pb), Carriles 2-5: Controles de referencia positivos DENV1-DENV4, Carril 6: amplificación de RNA de dengue virus en *Ae. albopictus* de una ovitrampa, Carril 7: control negativo (reactivos PCR)

Tabla 7. Pools de hembras y machos *Ae. albopictus* y *Ae. aegypti* procesados para la búsqueda de RNA del virus dengue por RT-PCR en cinco sitios de muestreo de los municipios Guadalupe y Santiago, cerca de la ciudad de Monterrey (abril-octubre, 2010).

Localidad	<i>Aedes albopictus</i>						<i>Aedes aegypti</i>					
	Ovitrampas			Aspirador de espalda			Ovitrampas			Aspirador de espalda		
	No. pools	Promedio de adultos	Pools positivos a DENV	No. pools	Promedio de adultos	Pools positivos a DENV	No. pools	Promedio de adultos	DENV positive pools	No. pools	Promedio de adultos	Pools positivos a DENV
Antonio Villalón	2	5.3	0	2	1	0	13	22.3	0	1	25	0
Area de Restaurantes	2	13.4	0	0	0	0	2	16.5	0	2	10	0
Panteón San Marco	16	20.5	0	4	10.8	0	9	23.4	0	2	10.7	0
Mahuacates	30	16.7	1	16	12.8	0	2	3.5	0	2	13.7	0
R. de la Sierra	18	15.8	0	13	14.2	0	6	20.8	0	2	23.2	0
Total	68		1	35		0	32		0	9		0

8.4. Cultivo celular C6/36 con macerado de mosquitos infectados

El volumen empleado para realizar la infección celular fue arbitrario, considerando que se desconocía el título viral y la capacidad infecciosa en el macerado de mosquito. Cada dos días se realizó evaluación morfológica por microscopía de contraste de fases para confirmar cambios en la monocapa celular. Los cambios iniciales en las células se observaron a partir de 4 días post-infección. Gradualmente se comenzaron a percibir formación de sitios líticos y aumento en la cantidad de detrito celular. A los 15 días post-infección los focos líticos se observan mejor distribuidos en la totalidad de la monocapa. Aparecen estructuras resultantes de la fusión de varias células, aparentando ser células gigantes. A diferencia del cultivo mantenido como control sin infección, las células se perciben estresadas y de forma irregular (Fig. 20).

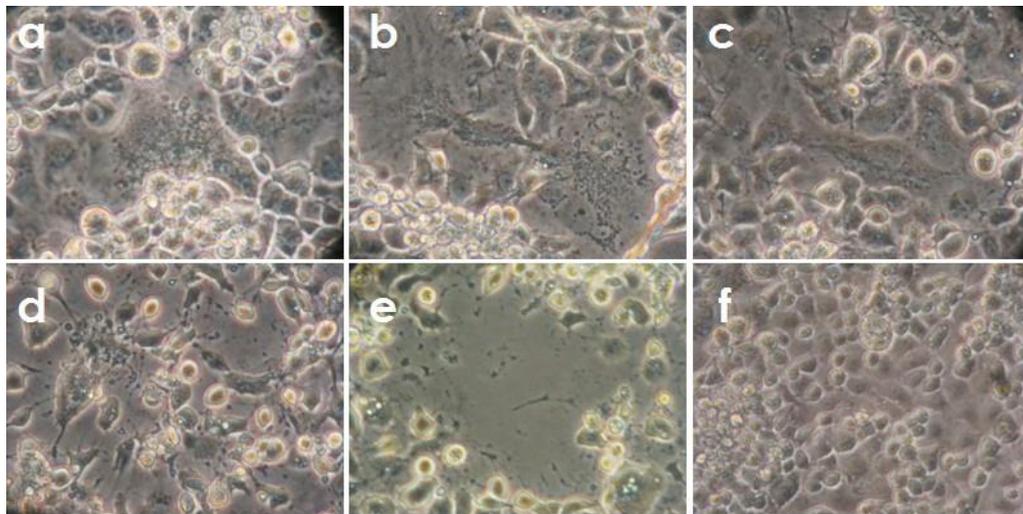


Fig. 20. Progreso de la infección viral registrado a varios tiempos en células C6/36 (40x, contraste de fases): a. 6 días post-infección, b. 8 días post-infección, c. 10 días post-infección, d. 12 días post-infección, e. 13 días post-infección, f. Células C6/36 sin infección viral

9. DISCUSIÓN

En esta investigación reportamos dos resultados interesantes sobre el papel de *Ae. albopictus* como vector potencial de DENV en México. En primer lugar, la infección transovárica de DENV del mosquito hembra criada a adulto a partir de huevos obtenidos de ovitrampas y segundo, se encontró que *Ae. aegypti* y *Ae. albopictus*, se superponen en los sitios de colecta. En cuanto a la infección por DENV, los primers utilizados para realizar la RT-PCR por el método de Lanciotti no fueron capaces de determinar cuál de los serotipos de DENV 1-4 se encontraba presente en la muestra bajo nuestras condiciones de laboratorio. El escenario epidemiológico con la transmisión del dengue activo en las localidades del estudio señaló a *Ae. albopictus* como el vector que ocasiona los casos. Esta es la segunda vez en las Américas, que *Ae. albopictus* ha sido encontrado infectado verticalmente con el DENV, similar a Reynosa, una ciudad situada a 200 km de distancia de nuestra área de estudio (1995) (Ibáñez-Bernal *et al.*, 1997). Este hallazgo puede estar relacionado con la aparición de brotes de dengue en Santiago en la temporada de colecta, donde se reportaron 21 casos de dengue clásico y 2 casos de dengue hemorrágico (SSA Nuevo León, 2012). El pool positivo se obtuvo en el verano del 2010, que también es consistente con estudios de *Ae. albopictus* en Rajashtan, India, que reportaron una mayor transmisión transovárica por DENV durante la temporada de verano (Ángel y Joshi, 2008). Curiosamente, nuestro análisis molecular sólo fue capaz de identificar las regiones Flaviviridae de RNA sin tener éxito en la determinación de los serotipos de DENV 1-4, aunque se ha documentado que el método RT-PCR es útil para el diagnóstico rápido de DENV con alta sensibilidad y especificidad. Numerosos factores pueden afectar la detección de DENV en los mosquitos, es decir, la temperatura

de refrigeración, incluyendo la técnica adecuada para las colectas de campo y el manejo de muestras en laboratorio (Lambrechts *et al.*, 2010). Esta técnica tiene un nivel de sensibilidad de entre 1.000 y 100.000 equivalentes de genoma viral en la RT-PCR para detectar el RNA del virus del dengue, y en la segunda ronda, o PCR anidada hay 100 equivalentes de genoma viral para detectar el virus en su vector (Lanciotti, 1992). Debido a que estos grupos se recogieron en un ambiente natural, las concentraciones virales son desconocidas y probablemente esta carga viral fue demasiado baja como para detectar el serotipo de la PCR anidada. Además, varios estudios han sugerido que la vigilancia de la transmisión vertical se produce a una tasa muy baja (Akbar *et al.*, 2008). Por desgracia, no fue posible realizar una RT-PCR mediante la técnica de Seah y col. (1995) con la muestra del pool positivo de hembras *Ae. albopictus* criadas desde huevo para complementar el hallazgo. Este ensayo de PCR anidada es específico para la detección y tipificación de solamente los virus del dengue utilizando primers dentro del gen NS3. Aparentemente, estos primers parecen ser significativamente más sensibles a la detección de dengue RNA viral. Por otra parte, la superposición de *Ae. aegypti* y *Ae. albopictus* en las poblaciones de los cinco sitios de estudio señala que las consecuencias de un punto de vista ecológico y epidemiológico de la vista. La competencia por un nicho tiene un papel con el desplazamiento de *Ae. aegypti* por *Ae. albopictus* en las zonas suburbanas y rurales, mientras que en las zonas urbanas *Ae. aegypti* es la especie predominante como se documenta en Florida (O'Meara *et al.*, 1995). Sin embargo, en términos de competencia del vector, en nuestras localidades el dengue es endémico con *Ae. aegypti* como el vector principal. Gubler y Kuno (1997) afirman que la viremia alta se asocia típicamente en casos de dengue hemorrágico asociados con la transmisión de *Ae. aegypti*, mientras que títulos bajos de virus se encuentran mas asociados a casos de

dengue clásico y *Ae. albopictus*. En la revisión de los viejos criterios de incriminación vectorial (Harwood y James, 1977), parece que en el Nuevo Mundo las poblaciones de *Ae. albopictus* indican que tarde o temprano los casos por este vector aumentarán . Por ejemplo, la asociación con el huésped en condiciones naturales y de conexión específica en el tiempo y espacio con infecciones clínicas fueron registradas durante el brote de Hawaii 2001-2002 (Effler *et al.*, 2005). La consistencia en albergar al agente infeccioso es apoyado por la transmisión vertical de Reynosa (Ibáñez-Bernal *et al.*, 1997) y los resultados de este estudio. Numerosos informes experimentales de infecciones de laboratorio se han realizado para la transmisión experimental (Hawley, 1988). Por otra parte, han ocurrido brotes de dengue autóctono como ocurrió en Key West Florida (MMWR, 2010) donde *Ae. aegypti* fue incriminado aunque *Ae. albopictus* se encontró presente al ser colectados, esto podría ser una aproximación al concepto de gradiente biológico y las poblaciones de vectores, por ejemplo, baja y alta en relación a la incidencia de bajo y alto de los casos. A pesar de una revisión exhaustiva para la comparación de la susceptibilidad de DENV en el campo y de laboratorio concluyó el importante papel de *Ae. aegypti* como responsable de grandes epidemias (Lambrechts *et al.*, 2010), los mismos autores revelaron en un meta-análisis que *Ae. albopictus* en laboratorio aumenta su susceptibilidad a las infecciones con el virus, sin embargo, la efectividad para la transmisión del virus disminuye al paso de las generaciones. Como afirman, el estado de este vector lleva un proceso dinámico que en el futuro podría cambiar de manera epidemiológicamente importante. En la última década se dieron informes de que *Ae. albopictus* transmite dengue hemorrágico, del cual el DENV-1 ha sido responsable. Esto ocurrió en Singapur, en donde además se realizan experimentos de competencia entre las especies de vectores en evolución (Chung, 2002).

10. CONCLUSION

Como ya se mencionó, *Ae. albopictus* en México no es considerado vector del dengue. Debido a esto, no existen reportes de las consecuencias epidemiológicas reales que implica la presencia de este mosquito en la naturaleza. *Ae. albopictus* es una especie que se ha expandido ampliamente en el mundo debido a sus características biológicas y Nuevo León no es la excepción. Esta especie ha tenido un gran éxito de adaptación y extensión debido a sus características biológicas y los rápidos ritmos en las actividades humanas. En este estudio, el virus del dengue fue detectado en un pool de cuatro hembras *Ae. albopictus* sin embargo no se logró identificar el serotipo presente debido a las bajas concentraciones de partículas virales y como consecuencia la poca amplificación en el producto de la PCR anidada. Este hallazgo sugiere que la transmisión vertical del virus del dengue en *Ae. albopictus* se encuentra presente en la localidad de Mahuacates en Santiago, la cual concuerda con las características biológicas que busca este vector. Así mismo, los resultados indican que este mosquito juega un importante rol en el mantenimiento del virus de forma vertical o transovárica en la naturaleza, esto posiblemente indicando un mecanismo de persistencia del dengue virus sin un medio ambiente urbano. Por lo anterior, debemos tomar acciones firmes en la evaluación constante de las posibles implicaciones y evolución de esta especie en los sitios donde es reportado. De tal forma que pueda ser prevenida una epidemia a causa de este mosquito que en la actualidad no es controlado y que habita principalmente áreas alejadas a la mancha urbana. La primer alerta ya fue emitida en 1995 y recientemente con esta investigación se hace un llamado a continuar con la labor de seguimiento de *Ae. albopictus* ya que nuevamente ha sido encontrado infectado con dengue.

LITERATURA CITADA

- Angel, MR, Joshi, V. 2008. Distribution and seasonality of vertically transmitted dengue viruses in *Aedes* mosquitoes in arid and semi-arid areas of Rajasthan, India. *J. Vector borne Dis.* 45:56-59.
- Akbar MR, Agoes R, Djatie T, Kodyat S. 2008. PCR detection of dengue transovarial transmissibility in *Aedes aegypti* in Bandung, Indonesia. *J Trop Med Parasitol.* 3:84-89.
- Bancroft TL, 1906. On the etiology of dengue fever. *Aust. Med. Gaz. (Sydney)* 25: 1.
- Briseño-García B, Gomez-Dantes H, Argott-Ramirez E, Montesano R, Veazquez-Martinez AL, Ibañez-Bernal S, Madrigal-Ayala G, Rhiz-Matus C, Flisser A, Tapia-Conyer R. 1996. Potencial risk for dengue hemorrhagic fever: the isolation of serotype dengue 3 in Mexico. *Emerg Infect Dis* 2:133-135.
- Cancrini, G, Frangipane di Regalbono A, Ricci I, Tessarin C, Gabrielli S, Pietrobelli M. 2003. *Aedes albopictus* is a natural vector of *Dirofilaria immitis* in Italy, *Vet Parasitol* 118: abstract.
- Casas-Martinez M, Torres-Estrada JL. 2003. First evidence of *Aedes albopictus* (Skuse) in Southern Chiapas, Mexico. *Emerging Infectious Diseases* 9:606-607.
- Centers for Disease Control and Prevention, (CDC) 1986. Update: *Aedes albopictus* infestation – United States. *Morb. Mort. Week Report* 41:649-651.
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). 2011. A largest outbreak of Dengue in Puerto Rico. Disponible en el sitio: www.cdc.gov/dengue
- Centro Nacional de Vigilancia Epidemiológica (CENAVE) México. 2012. Infección por virus del dengue. <http://www.cenave.gob.mx/dengue/default.asp?id=24>
- Clave geoestadística (a): 19049. Prontuario de información geográfica municipal de los Estados Unidos Mexicanos. Santiago, Nuevo León. 2009.
- Clave geoestadística (b): 19026. Prontuario de información geográfica municipal de los Estados Unidos Mexicanos. Guadalupe, Nuevo León. 2009.
- Chadee DD, Corbet PS. 1987. Seasonal incidence and patterns of oviposition in the field of the mosquito *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) in Trinidad, West Indies: a preliminary study. *Ann Trop Med Parasitol.* 81:151–161.

- Chen YC, Wang SY, King CC, 1999. Bacterial lipopolysaccharide inhibits dengue virus infection of primary human monocytes/macrophages by blockade of virus entry via a CD14-dependent mechanism. *J Virol* 73:2650-2657.
- Chung YK and Pang FY. 2002. Dengue virus infection rate in field populations of female *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in Singapore. *Trop Med and Intl. Health* 7:322-325.
- Clark G, Gubler, DJ. 1994. Use of the CDC backpack aspirator for surveillance of *Aedes aegypti* in San Juan, Puerto Rico. *J Am Mosq Control Assoc.* 10:119-124.
- Clements AN. 1992. The biology of mosquitoes. Development, nutrition and reproduction. Chapman and Hall, London.
- Consoli-Rotraut AGB e De Oliveira RL. 1994. Principais mosquitos de importancia sanitaria no Brasil. Editora Fiocruz. pp 228. Libro en línea disponible en: <http://books.scielo.org/id/th>
- Darsie, RF, Ward, RA. Identification and Geographical Distribution of the Mosquitoes of North America, North of Mexico. Gainesville, FL: University Press of Florida, 2005.
- Díaz FJ, Farfán-Ale A, Olson KE, Loroño-Pino MA, Gubler DJ, Blair CD, Black IV WC, Beaty BJ. 2002. Genetic variation within the premenbrane coding region of dengue viruses from the Yucatan Peninsula of Mexico. *Am J Trop Med Hyg.* 1:93-101.
- Effler PV, Pang L, Kitsutani P, Vorndam V, Nakata M, Ayers N, Elm J, Tom T, Reiter P, Rigau-Perez JG, Hayes JM, Mills K, Napier M, Clark G, Gubler DJ. 2005. Dengue Fever, Hawaii, 2001–2002. *Emerging Infectious Diseases* 11:472-479.
- Enserink M. 2008. A mosquito goes global. *Science* 320:864-866.
- Eritja R, Escosa R, Lucientes J., Marque E, Molina R, Roiz D, Ruiz S. 2005. Worldwide Invasion of Vector Mosquitoes: Present European Distribution and Challenges for Spain, *Biological Invasions* 7: 87–97.
- Estrada-Franco JG, Craig GB. 1995. Biología, relaciones con enfermedades y control de *Aedes albopictus*. *Organización Panamericana de la Salud* 42:1–52.
- Fadilah SAW, Sahrir S, Raymond AA, Cheong SK, Aziz JA, Sivagengei K. 1999. Quantitation of T lymphocyte subsets helps to distinguish dengue hemorrhagic fever from classic dengue fever during the acute febrile stage. *Southeast Asian J Trop Med Public Health.* 4:710-717.
- Forattini OP. 1986. *Aedes* (*Stegomyia*) *albopictus* (Skuse) identificacion en Brasil. *Rev. Salud Publ.* 3:244-245.

- Garcia-Rejon J, Loroño-Pino MA, Farfán-Ale JA, Flores-Flores L, Rosado-Paredes E, Rivero-Cardenas N, Najera-Vazquez R, Gomez-Carro S, Lira-Zumbardo V, Gonzalez-Martinez P, Lozano-Fuentes S, Elizondo-Quiroga D, Beaty BJ, Eisen L. 2008. Dengue Virus-Infected *Aedes aegypti* in the Home Environment. *Am J Trop Med Hyg*;79:940-950.
- Gómez-Dántes H. 1992. Monografía sobre la epidemiología del dengue en México. Secretaría de Salud, México. pp. 43-53.
- Goodsell D. 2008. Dengue Virus. July Molecule of the Month. doi: 10.2210/rcsb_pdb/mom_2008_7 (PDF Version, ePub Version).
- Gubler DJ, Kuno G, Velez M, Oliver A. 1985. Comparative sensitivity of three mosquito cell lines for isolation of dengue viruses. *Bull World Health Organ*. 2:279-86.
- Gubler DJ. Dengue. In: *Epidemiology of arthropod-borne viral disease*. 1988. Monath TPM, editor. Boca Raton (FL), pp 223-260.
- Gubler DJ, Kuno G. Dengue and Dengue hemorrhagic fever. 1997. New York: CAB International; 61–88.
- Gubler DJ, 1998. Dengue and dengue hemorrhagic fever. *Clin Microbiol Rev* 11: 480-496.
- Guzmán MG, Kourí G, Morier L, Soler M, Fernández A. 1984. Casos mortales de dengue hemorrágico en Cuba, 1981. *Bol J Sanit Panam*. 97:111-117.
- Guzmán MG, Kourí GP, Bravo J. 1990. Dengue haemorrhagic fever in Cuba, 1981: a retrospective seroepidemiologic study. *Am J Trop Med Hyg*. 2: 235-243.
- Guzmán MG, Halstead SB, Artsob H, Buchy P, Farrar J, Gubler DJ, Hunsperger E, Kroeger A, Margolis HS, Martínez E, Nathan MB, Pelegrino JL, Simmons C, Yoksan S, Peeling RW. 2010. Dengue: A continuing global threat. *Nat Rev Microb*. 8:7–16. doi:10.1038/nrmicro2460
- Harwood RF, James MT. *Entomology in human and animal health*. 1979. MacMillan Publishing Co. Inc. New York, New York. pp 50.
- Hawley WA. 1988. The biology of *Aedes albopictus*. *J Am Mosq Control Assoc*. Supplement pp.1-40.
- Huang YM. 1972. Contributions to the mosquito fauna of Southeast Asia XIV: The subgenus *Stegomyia* of *Aedes* in Southeast Asia I: The *scutellaris* group of species. *Contr. Amer. Ent. Inst.* 1:1-109.

- Ibáñez-Bernal S, Martínez-Campos C. 1994. *Aedes albopictus* in Mexico. J Am MosqControl Assoc. 2:231-232
- Ibáñez-Bernal S, Briseño B, Mutebi JP, Argot E, Rodríguez G, Martínez C, Paz R, de la Fuente-San Román P, Tapia-Conyer R, Flisser A. 1997. First record in America of *Aedes albopictus* naturally infected with dengue virus during the 1995 outbreak at Reynosa, México. Med Vet Entomol 11:305-309.
- Igarashi A. 1978. Isolation of a Singh's *Aedes albopictus* cell clone sensitive to Dengue and Chikungunya viruses. J Gen Virol. 3:531-44.
- Imai C. y O'Meada. 1976. Several factors effecting on hatching of *Aedes albopictus* eggs. Jap J Sanit Zool. 27:362-372.
- INEGI. Censo de Población y Vivienda 2010.
<http://www.inegi.org.mx/sistemas/mexicocifras/default.aspx?ent=19&mun=049&src=487>
- Instituto de Medicina Tropical (IMT) 'Dr. Pedro Kouri', La Habana, Cuba. 2003. Tecnicas de laboratorio para el diagnostico y la caracterización del virus del dengue.
- Ishak H, Miyagi I, Toma T, Kamimura K. 1997 . Breeding habitats of *Aedes aegypti* (L) and *Aedes albopictus* (Skuse) in villages of Barru, South Sulawesi, Indonesia [Southeast Asian. J Trop Med Public Health](#). 4:844-850.
- Kay BH, Ives WA, Whelan PI, Baker-Hudson P, Fanning ID, Marks EN. 1990. Is *Aedes albopictus* in Australia?. Med J of Australia 1:31-34.
- Knudsen AB. 1996. Occurrence and spread in Italy of *Ae. albopictus*, with implications for its introduction into other parts of Europe. J Am Mosq Control Assoc. 12:177-183.
- Kourí GP, Gúzman MG, Bravo JR, Triana C. 1989. Dengue haemorrhagic fever/dengue shock syndrome: lessons from the cuban epidemic-1981, Bull World Health Organ. 4:375-380.
- Lambrechts, L, Scott, TW, Gubler, DJ. 2010. Consequences of the expanding global distribution of *Aedes albopictus* for Dengue virus transmission. Plos Neglected tropical diseases. 4:1-9.
- Lanciotti, RS, Calisher, CH, Gubler, DJ, 1992. Rapid detection and typing of dengue viruses from clinical samples by using reverse transcriptase-polymerase chain reaction. J. Clin Microbiol. 30:545-551.

- Linley JR. 1989. Comparative fine structure of eggs of *Aedes albopictus*, *Ae. aegypti* and *Ae. bahamensis* (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol.* 26:510-521.
- Lounibos LP. 2002. Invasions by Insect Vectors of Human Disease, *Ann Rev Entomol* 47:233-266.
- Marquetti MC, Valdés V, Aguilera L. 2000. Tipificación de hábitats de *Aedes albopictus* en Cuba y su asociación con otras especies de culícidos, 1995-1998. *Rev Cubana Med Trop.* 3:170-174.
- Martínez-Muñoz JP. Ecología larvaria de *Aedes albopictus* en el noreste de México. 1995. Thesis. Universidad Autónoma de Nuevo León.
- McBride WJ, Bielefeldt-Ohmann H. 2000. Dengue viral infections; pathogenesis and epidemiology. *Microbes Infect* 9:1041-1050.
- Mitchell, CJ, Miller, BR. 1990. Vertical transmission of dengue viruses by strains of *Aedes albopictus* recently introduced into Brazil. *J Am Mosq Control Assoc.* 6:251-253.
- Mitchell CJ. 1995. Geographic spread of *Aedes albopictus* and potential for involvement in arbovirus cycles in the Mediterranean basin.. *J. Vector Ecol.* 20:44-58.
- Monath TP. 1994. Dengue: the risk to developed and developing countries, *Proc. Nat Acad Sci.* 90:2395-2400.
- Moore CG, Francy DB, Eliason DA, [Monath TP](#). 1988. *Aedes albopictus* in the United States: rapid spread of a potential disease vector. *J Am Mosq Control Assoc.* 4:356-361.
- Moore CG. 1999. *Aedes albopictus* in the United States: Current status and prospects for further spread. *J Am Mosq Control Assoc.* 15:221-227.
- Morbidity and Mortality Weekly Report (MMWR). 2010. Locally acquired Dengue Key West, Florida, 2009-2010. *Center for Disease Control and Prevention* 59:577-581.
- Nelson MJ. 1986. *Aedes aegypti*: biology and ecology. Washington DC: Panamerican Health Organization, 1986 (PNSP/86-63).
- Novak R. 1992. The Asian tiger mosquito: *Aedes albopictus*. *Wing Beats. J Am Mosq Control Assoc.* 3:5.
- O'Meara GF, Gettman AD, Evans LF, Curtis GA. 1993. The spread of *Aedes albopictus* in Florida. *J Am Entomol.* 39:163-172.

- O'Meara, GF, Evans, Jr, Gettman, and J. P. Cuda. 1995. Spread of *Aedes albopictus* and decline of *Ae. aegypti* (Diptera: Culicidae) in Florida. *Journal of Medical Entomology*. 32:554–562.
- Organización Panamericana de la Salud (OPS). 1987. *Aedes albopictus* en las Américas. *Bol of Sanit Panam*. 6:624-633.
- Orta-Pesina, H, Mercado-Hernandez, R, Valdez-Rodriguez, MA. 2001. *Aedes albopictus* in Allende City, Nuevo Leon, Mexico. *J Am Mosq Control Assoc*. 17:260-261.
- Orta-Pesina H, Mercado-Hernández R, Elizondo-Leal JF. 2005. Distribución de *Aedes albopictus* (Skuse) en Nuevo León, México, 2001-2004. *Salud pública de México*. 47:163-165.
- Pan American Health Organization (PAHO). 1979. *Dengue in the Caribbean*, Washington DC: PAHO/WHO, (Scientific Publication no 375).
- Pérez O, Rodríguez J, Bisset JA, Leyva M, Díaz M, Fuentes O, Ramos F, González R, García I. 2004. *Manual de Indicaciones - Técnicas para Insectarios*. Ciudad de La Habana, Editorial Ciencias Médicas
- Pinheiro FP. 1989. El dengue en las Américas 1980-1987. *Bol Epidemiol* 1:1-8.
- Rodhain F. 1995. *Aedes albopictus*: A potential problema in France, *Parasitol* 37:155-119.
- Rodríguez-Tovar ML, Ortega-Martínez MG. 1994. *Aedes albopictus* in Muzquiz City Coahuila, Mexico. *J Am Mosq Control Assoc*. 4:587.
- Rosen L, Roseboom LE, Gubler DJ, Lien JC, Chaniotis BN. 1985. Comparative susceptibility of mosquito species and strains to oral and parenteral infection with Dengue and Japanese encephalitis viruses. *Am J Trop Med Hyg*. 34:603-615.
- Rosen, L. 1988. Further observations on the mechanism of vertical transmission of flaviviruses by *Aedes* mosquitoes. *Am J Trop Med Hyg*. 39:123-126.
- Rosen L. 1999. Comments on the epidemiology, pathogenesis and control of dengue. *Med Trop (Mars)* 59:495-498.
- Rudnick A, Chan YC. *Science*. 1965. 149:638-639.
- Salomón-Grajales J, Lugo-Moguel JV, Tinal-Gordillo VR, de La Cruz-Velázquez J, Beaty B, Eisen L, Lozano-Fuentes S, Moore CG, García-Rejón JE. 2012. *Aedes albopictus* Mosquitoes, Yucatan Peninsula, *Emerg Infect Diseases* 18:525-527.
- Sánchez-Rodríguez OS, Laguna-Aguilar M, Alvarado-Moreno MS, Fernández-Salas I, 2011. Use of ovitraps to incriminate vertical transmission of *Aedes albopictus* as

DENV vector in two suburban localities of Santiago, Northeastern Mexico. Latin American Symposium at the 77th AMCA Annual Meeting. 2011, California, USA (abstract).

Sawabe K, Isawa H, Hoshino K, Sasaki T, Roychoudhury S, Higa Y, Kasai S, Tsuda Y, Nishiumi I, Hisai N, Hamao S, Kobayashi M. 2010. Host-Feeding Habits of *Culex pipiens* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) collected at the Urban and Suburban Residential Areas of Japan. *J Med Entomol.* 3:442-450.

Scott TW, Clark GG, Lorenz LH, Amerasinghe PH, Reiter P, Edman JD. 1993. Detection of multiple blood feeding in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) during a single gonotrophic cycle using a histologic technique. *J Med Entomol.* 1:94-99.

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

Secretaría de Salud (Ssa). 2000. Disponible en: http://www.ssaver.gob.mx/Servicios_de_Salud/BoletinEpidem/Boletines/200026/page17.html

Secretaria de Salud (Ssa) 2010. Disponible en: http://www.ssaver.gob.mx/Servicios_de_Salud/BoletinEpidem/Boletines/2010-28/page19.html

Secretaría de Salud (Ssa) 2012. Disponible en: <http://www.dgepi.salud.gob.mx/boletin/2012/sem14/pdf/cua7.1.pdf>

Siler JF, Hall MW, Hitchens AP. 1926. Dengue: its history, epidemiology, mechanism of transmission, etiology, clinical manifestations, immunity, and prevention. *Philipp J Sci.* 29:1-304.

Singh KR, Pavri KM. 1967. Experimental studies with chikungunya virus in *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. *Acta Virol.* 6:517-26.

Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica (SINAVE), 2005. 22:15.

Sprenger D, Wuithiranyagool T. 1986. El descubrimiento y la distribución de *Aedes albopictus* en el Condado de Harris, Texas. *J Am Mosq Control Assoc.* 2:217-219.

Tandon N, Ray S. 2000. Host Feeding Pattern of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in Kolkata India. *Dengue Bulletin.* 24:117-120.

Thenmozhi V, Gowder HG, Chandra S, Samuel PP, Paramasivan R, Rajendran R, Ramasamy T, Kishore M. 2007. Natural vertical transmission of dengue virus in

Aedes albopictus (Diptera: Culicidae) in Kerala, a Southern Indian state. *Jpn J Infect Dis.* 60:245-247.

Universidad de Carolina del Sur (UCS), Estados Unidos, 1982. Curso Internacional control de vectores y epidemiología y control de enfermedades transmitidas por vectores (memorias)

Vezzani D, Carbajo AE. 2008. *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus*, and dengue in Argentina: current knowledge and future directions. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro* 1:66-74.

World Health Organization (WHO). 2000. Disponible en :
<http://www.who.int/csr/disease/dengue/impact/en/>

World Health Organization (WHO). 2005. Disponible en:
<http://www.who.int/csr/disease/dengue/impact/en/>

World Health Organization (WHO). 2006. Disponible en :
<http://www.who.int/csr/disease/dengue/impact/en/>

World Health Organization (WHO). 2007. Disponible en :
<http://www.who.int/csr/disease/dengue/impact/en/>

World Health Organization (WHO). 2009. Dengue: Guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control. New Edition. Geneva.

Zar, JH. Bioestatistical analysis. ed Prentice-Hall. Fourth edition. Englewood Cliffs, NJ. 1999.