

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN CIENCIAS VETERINARIAS



DETECCIÓN MOLECULAR DE VIRUS DENGUE EN MOSQUITOS
(*Aedes aegypti* y *Aedes albopictus*) DE MEXICALI, BAJA CALIFORNIA,
MÉXICO

TESIS
COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS VETERINARIAS

PRESENTA
M.V.Z DIANA PATRICIA VALDEZ SILVESTRE

DIRECTOR DE TESIS
DR. ENRIQUE TRASVIÑA MUNOZ

MEXICALI, B. C., MÉXICO

DICIEMBRE DE 2023

Detección molecular de virus dengue en mosquitos (*Aedes aegypti*, *Aedes albopictus*) de Mexicali, Baja California, México. Tesis presentada por Diana Patricia Valdez Silvestre, como requisito parcial para obtener el grado de Maestra en Ciencias Veterinarias, que ha sido aprobada por el comité particular indicado:

**DR. ENRIQUE TRASVIÑA MUÑOZ
DIRECTOR DE TESIS**

**DR. SERGIO DANIEL GÓMEZ GÓMEZ
SECRETARIO**

**DR. GILBERTO LÓPEZ VALENCIA
SINODAL**

**DR. FRANCISCO JAVIER MONGE NAVARRO
SINODAL**

**DR. SALVADOR ORDAZ SILVA
SINODAL**

MEXICALI, B. C., MÉXICO, DICIEMBRE 2023

AGRADECIMIENTOS

En primera instancia expreso mi más sincero agradecimiento a todas y cada una de las personas que estuvieron brindándome su apoyo y conocimiento a lo largo de la realización de esta tesis.

En primer lugar, agradezco a CONAHCYT y al Instituto de Investigaciones en Ciencias Veterinarias, por la oportunidad y confianza que me brindaron durante todo este tiempo para culminar con éxito mi proyecto de Maestría.

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento con especial afecto, al Dr. Francisco Javier Monge Navarro, quien me brindó su apoyo incondicional, confianza y conocimiento.

Así mismo, expreso mi más profundo agradecimiento a mi director de tesis el Dr. Enrique Trasviña Muñoz y codirector el Dr. Sergio Daniel Gómez Gómez, por su empeño, dedicación, apoyo y paciencia. Por ser un guía durante este tiempo y aportar todo su conocimiento para la elaboración de esta tesis.

Y, por último, agradezco a mis compañeros de maestría que siempre fueron una red de apoyo durante todo este tiempo. Especialmente a mis compañeras y amigas Marina Moreno y Adriana Cervantes, quienes fueron un apoyo incondicional y de motivación durante todos mis estudios de Maestría.

DEDICATORIA

A mis queridos padres Sergio y Diana, quienes me han brindado su apoyo y amor incondicional. Por ser siempre una fuente de inspiración y motivación para salir adelante. Gracias por siempre creer en mí y guiarme a lo largo del camino.

A mi amado esposo Jorge Luis, por ser mi compañero y mano derecha, por demostrarme toda su confianza y amor. Gracias por ser esa persona que me ayudó a salir adelante en los momentos difíciles.

A mis mejores amigos Iván, Alejandra y Marlene, quienes nunca me han dejado, y han demostrado su lealtad y confianza. Que siempre tienen palabras de apoyo que me impulsan a salir adelante.

A mis compañeras y amigas Marina y Adriana, quienes fueron pieza clave a lo largo de mis estudios de Maestría. Que siempre estuvieron para mí, brindándome sus consejos y experiencia. Con las que compartí momentos inigualables que siempre llevaré en mi corazón.

RESUMEN

Detección molecular de virus dengue en mosquitos (*Aedes aegypti* y *Aedes albopictus*) de Mexicali, Baja California, México

El dengue es una enfermedad viral de distribución mundial transmitida por mosquitos del género *Aedes*. Los casos clínicos presentan un cuadro con fiebre, náuseas, dolor de cabeza, sarpullido, dolor muscular y articular, con cuadros graves que producen fiebre hemorrágica, shock y muerte. El dengue se diagnostica empleando pruebas serológicas que detectan anticuerpos tipo IgG, IgM o antígeno viral NS1, así como empleando distintas plataformas moleculares que detectan genes virales que producen resultados con altos niveles de sensibilidad y especificidad. Ambas técnicas se utilizan en programas de diagnóstico, genotipificación y vigilancia epidemiológica del dengue. Actualmente, Baja California no cuenta con estudios científicos que confirmen la presencia de *Aedes aegypti* en la región ni la presencia del virus del dengue en ese vector, siendo el objetivo de este trabajo, identificar la presencia del vector en la región y determinar la presencia del virus del dengue en mosquitos *Aedes aegypti*. Se muestrearon 4 zonas de Mexicali, Baja California, por medio del uso de una red de malla fina y la técnica de sebo humano, se obtuvieron un total de 4,161 mosquitos, de enero a octubre de 2023. Las muestras de mosquitos fueron clasificados morfológicamente obteniendo un total de 545 mosquitos de la especie *Aedes aegypti*. Un total de 436 (80%) identificadas como hembras, las cuales fueron analizadas por técnicas RT-PCR para la detección universal del virus del dengue, agrupados por mes y zona de muestreo. Se identificó el virus

Dengue en las zonas del norte y sureste de Mexicali, durante los meses de junio, septiembre y octubre de 2023. Seis de las 11 clases o grupos de *A. aegypti* analizadas resultaron positivas para el virus del dengue, lo que representa un 54% del total de muestras. De las hembras analizadas del noroeste, el 50% resultaron positivas, mientras que para las zonas de noreste y sureste fue de 100 y 66.6%, respectivamente; las muestras colectadas del suroeste fueron negativas en su totalidad respecto a la presencia del virus

Palabras clave: Dengue, diagnóstico, *Aedes aegypti*.

ABSTRACT

Molecular detection of dengue virus in mosquitoes (*Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*) from Mexicali, Baja California, Mexico.

Dengue is a worldwide viral disease transmitted by *Aedes* genus. Clinical manifestations are fever, nausea, headache, rash, muscle and joint pain, with severe cases resulting in hemorrhagic fever, shock and death. Dengue is diagnosed using serological tests that detect IgG, IgM or NS1 viral antigen antibodies. It is also diagnosed using different molecular platforms which detect viral genes with high levels of sensitivity and specificity. Both techniques are used in dengue diagnosis, genotyping and epidemiological surveillance programs. Currently, Baja California does not have scientific studies that confirm the presence of *Aedes aegypti* in the state nor the presence of dengue virus in this vector. The objective of this work is to identify the presence of the vector in the region and to determine the presence of dengue virus in *Aedes aegypti* mosquitoes. Four areas of Mexicali, Baja California, were sampled using a fine mesh net and the human tallow technique, a total of 4,161 mosquitoes were obtained from January to October 2023. The mosquito samples were morphologically classified, identifying a total of 545 mosquitoes of the genus *Aedes aegypti*. A total of 436 (80%) were classified as females, which were tested by RT-PCR techniques for detection of dengue virus, grouped by month and sampling area. Dengue virus was identified in the northern and southeastern areas of Mexicali, during the months of June, September and October 2023. Six of the 11 classes or groups of *A. aegypti* tested were positive for dengue virus, representing 54% of the total number of samples. Of the females tested from the

northwest, 50% were positive, while for the northeast and southeast it was 100 and 66.6%, respectively; samples collected from the southwest were entirely negative for the presence of the virus.

Key words: Dengue, diagnosis, *Aedes aegypti*.

CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS	i
DEDICATORIA	ii
RESUMEN.....	iii
ABSTRACT	v
CONTENIDO.....	vii
LISTA DE CUADROS.....	ix
LISTA DE FIGURAS.....	x
INTRODUCCIÓN	1
REVISIÓN DE LITERATURA.....	3
Características y estructura del virus del dengue	3
<i>Estructura del virus del dengue.....</i>	4
<i>Transmisión y características de los vectores del dengue</i>	6
Epidemiología	9
<i>Situación epidemiológica de dengue a nivel mundial.....</i>	9
<i>Situación del dengue en América.....</i>	10
<i>Situación epidemiológica del dengue en México</i>	11
Respuesta inmune celular	11
Respuesta humoral y respuesta dependiente de anticuerpos.....	13
Métodos convencionales para la detección del virus del dengue	14
<i>Diagnóstico clínico</i>	15
<i>Diagnóstico serológico</i>	17
<i>Pruebas ELISA basadas en IgM.....</i>	17
<i>Pruebas ELISA basadas en NS1.....</i>	18
<i>Pruebas ELISA basadas en IgG.....</i>	19
<i>Pruebas basadas en la amplificación de ácidos nucleicos.....</i>	20
<i>Pruebas basadas en la detección de técnicas de reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR).....</i>	20
<i>Pruebas de reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real o reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa.....</i>	21
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	25
JUSTIFICACIÓN	26
OBJETIVOS	27
Objetivo general	27

Objetivos específicos.....	27
MATERIALES Y MÉTODOS	28
Diseño del estudio.....	28
Duración del estudio	28
Lugar de toma de muestra.....	28
Criterios de inclusión y de exclusión	29
Tamaño de muestra.....	29
Metodología	30
<i>Captura y clasificación de mosquitos.....</i>	30
<i>Extracción de ARN de mosquitos.....</i>	31
<i>Oligonucleótidos para la secuencia de un fragmento homólogo de la NS5 polimerasa de los 4 genotipos del virus dengue</i>	31
<i>Estandarización para la prueba RT- PCR en tiempo real.....</i>	33
<i>Protocolo para la prueba RT- PCR en tiempo real.....</i>	34
RESULTADOS	36
<i>Resultados de la estandarización del RT-PCR en tiempo real para un fragmento homólogo de la polimerasa NS5.....</i>	38
<i>Resultados de la curva estándar del gen NS5.....</i>	39
<i>Resultados de RT-PCR para la detección del dengue.....</i>	40
DISCUSIÓN	41
CONCLUSIÓN.....	44
REFERENCIAS	45

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1	Criterios clínicos para clasificación del dengue en humanos.....	16
Cuadro 2	Características de los oligonucleótidos para un fragmento homólogo del gen de la polimerasa de los 4 genotipos del virus del dengue.....	33
Cuadro 3	Optimización de reactivos, concentración y volumen final para un fragmento homólogo del gen de la polimerasa de los 4 genotipos del virus del dengue.....	35
Cuadro 4	Mes y cuadrante donde se encontraron hembras de <i>Aedes aegypti</i>	37

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Estructura viral del dengue.....	5
Figura 2	Cuadrantes de muestreo de mosquitos.....	29
Figura 3	Mapa con la distribución de <i>Aedes aegypti</i> en Mexicali, Baja California	36
Figura 4	Cantidad de mosquitos colectados por mes.....	38
Figura 5	Curva de amplificación de los controles de NS5 y Curva de disociación (Tm) de los controles positivos.....	39
Figura 6	Curva estándar para gen NS5 polimerasa del virus del dengue.....	39

INTRODUCCIÓN

El dengue es la enfermedad viral más común transmitida por artrópodos mosquitos al hombre, convirtiéndose en un problema serio de salud pública. Factores relacionados al comportamiento humano como la urbanización, el incremento en los viajes, factores climáticos y factores virales han contribuido al incremento de casos reportados alrededor del mundo (Gupta et al., 2012). El virus del dengue (DENV) pertenece al género *Flavivirus* de la familia *Flaviviridae*, consta de cuatro genotipos (DENV1, DENV2, DENV3, DENV4), los cuales comparten aproximadamente el 65% de su genoma, pero no los relacionan antigénicamente (Guzmán et al., 2010). Los DENV ocasionan patologías que pueden manifestarse como una infección leve asintomática, hasta un cuadro severo de fiebre hemorrágica, llegando incluso a producir el síndrome de choque por dengue. Se estima que cerca de 3,600 millones de personas están en riesgo de contraer dengue alrededor del mundo con 390 millones de casos de infección cada año (Murugesan et al., 2020).

El diagnóstico preciso en etapas tempranas de la enfermedad es de suma importancia tanto para el manejo clínico de la enfermedad, como para establecer las medidas de control y vigilancia epidemiológica de la enfermedad. El dengue puede diagnosticarse por medio de los signos clínicos de la enfermedad, sin embargo, las manifestaciones clínicas fácilmente se pueden confundir con otras enfermedades infecciosas como leptospirosis, malaria y fiebre tifoidea entre otras; asimismo, la infección por dengue también puede diagnosticarse a través

de pruebas serológicas que detectan anticuerpos tipo IgG e IgM dirigidas contra proteínas específicas para cada genotipo del dengue o también, a través de pruebas moleculares como las técnicas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) que amplifican fragmentos de genes específicos del virus (Gulati and Maheshwari, 2012; Rafaat et al., 2019).

Actualmente, no se cuenta con disponibilidad de una terapia antiviral específica ni eficiente para tratar la infección producida por el virus del dengue. Recientemente Sanofi Pasteur desarrolló la primera vacuna contra el dengue, la vacuna Dengvaxia (CYD-TDV), aprobada y comercializada a partir del año 2015 en 20 países, sin embargo, debido a problemas de eficacia y seguridad, su uso está restringido a personas con evidencia serológica al virus y en el grupo de edad de alto riesgo entre 9 y 45 años (Herrera, 2021).

Con base en lo anterior se planteó como objetivo la detección molecular de virus del dengue en mosquitos (*Aedes aegypti* y *Aedes albopictus*) en Mexicali, Baja California.

REVISIÓN DE LITERATURA

Características y estructura del virus del dengue

El dengue es una enfermedad ampliamente distribuida en el mundo, es producida por el virus del dengue (DENV). El dengue se transmite por la picadura de mosquitos del género *Aedes*, de los cuales *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus* se reconocen como los principales vectores de esta familia de virus en la mayoría de las zonas endémicas del planeta (Ferede et al., 2018; Kamal et al., 2018; Udayanga et al., 2018). El DENV es capaz de generar enfermedad en humanos de todas las edades (Tsang et al., 2019); la enfermedad puede generar un amplio espectro de manifestaciones clínicas, que puede ir desde un cuadro leve similar al de la gripe conocido como fiebre por dengue (FD), hasta un cuadro severo con sintomatología de fiebre hemorrágica, conocido como síndrome de choque por dengue (SCD) (Guzmán et al., 2016). Dentro de los signos típicos que se pueden manifestar en la FD se encuentra la fiebre, dolor de cabeza intenso, dolores articulares, vómito y erupciones cutáneas, por otro lado, el SCD es potencialmente mortal ya que pueden ocurrir hemorragias graves, debido principalmente a una disminución severa en el número de plaquetas y el deterioro de órganos (CDC, 2021).

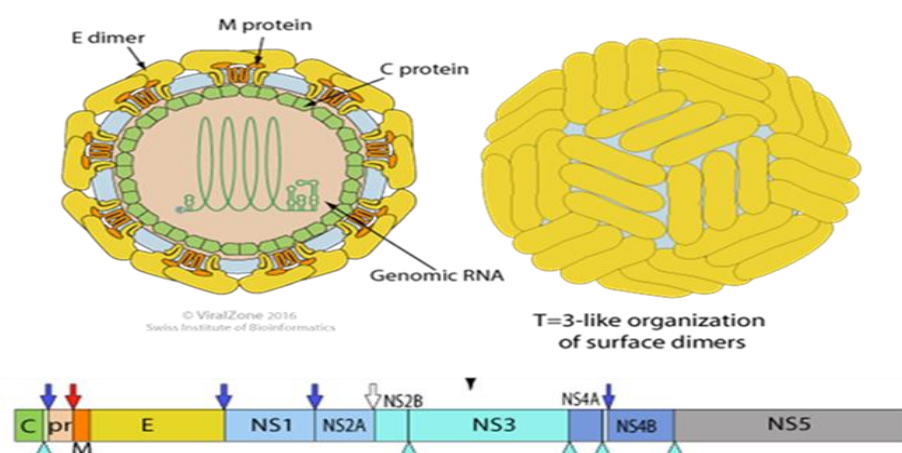
Con el propósito de establecer criterios clínicos uniformes y más sencillos que proporcionen un enfoque global estandarizado para la clasificación de la enfermedad, en 2009, la Organización Mundial de la Salud (OMS) modificó los criterios para el manejo clínico del dengue y las clasificaciones existentes de la

infección por este virus, sustituyendo al cuadro de Fiebre hemorrágica (FHD) y el síndrome de choque como dengue con o sin signos de alarma y dengue grave (OMS/TRD, 2009).

Estructura del virus del dengue

El virus del dengue pertenece a la familia *Flaviviridae*, género *Flavivirus*, que consta de cuatro genotipos virales (DENV1 - DENV4). El DENV posee un genoma de ARN de banda sencilla y polaridad positiva con una longitud promedio de 11,000 nucleótidos que codifica para tres proteínas estructurales: Cápsula (proteína C), pr^m/Membrana (proteína M) y Envoltura (proteína E) y siete proteínas no estructurales (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5). Los cuatro genotipos de esta familia de virus comparten aproximadamente el 65% de su secuencia de aminoácidos (Guzmán et al., 2010, Murugesan et al., 2020) (Fig. 1), lo cual hace difícil predecir el resultado de una infección, ya que la infección por un genotipo del virus confiere inmunidad específica del genotipo, sin embargo, existe un mayor riesgo de desarrollar dengue grave en una segunda infección por un genotipo diferente (Halstead, 2002, Simmons et al., 2012). La proteína C (11kDa) forma la cápside que envuelve al genoma, y está rodeada por una bicapa lipídica en la que se incrustan las proteínas pr^m/M y E (Wilder-Smith et al., 2019), la proteína precursora de membrana pr^m (26 kDa) se encuentra presente en los viriones inmaduros, la transducción de esta proteína da como resultado, la proteína M (8kDa), ambas participan en la maduración del virus (Li et al., 2008). La proteína E, tiene un peso molecular de 50 kDa, es crucial para la unión y fusión del virus a la membrana de

la célula del huésped y contiene los epítomos necesarios para la neutralización por los anticuerpos que se formarán después de la infección (Zhang et al., 2004, Velandia y Castellanos, 2011). Las proteínas no estructurales desde NS1 a NS5 participan en la replicación viral ya que juegan un papel importante en la interacción con las proteínas del huésped necesarias para la replicación exitosa del virus (Dwivedi et al., 2017).



Fuente: https://viralzone.expasy.org/43?outline=all_by_species

Figura 1. Estructura del virus del dengue.

La proteína no estructural 1 (NS1) (45 a 55 kDa), es la única proteína no estructural que puede expresarse de diferentes formas, dentro del citosol, unida a la membrana celular y secretada como hexámero. La NS1 en su forma intracelular está involucrada en la replicación viral (Muller and Young, 2013), la NS1 expresada en la membrana celular está involucrada en los procesos de transducción de señales (Jacobs et al., 2000), por último, la NS1 secretada (sNS1), interactúa con el sistema de complemento y puede permitir que el virus del dengue evite el sistema inmune. Finalmente, se utiliza como un biomarcador

para el diagnóstico de la enfermedad en etapas tempranas (Muller and Young, 2013). La NS2A (22 kDa), está involucrada en los procesos de ensamblaje y replicación viral. Mediante mecanismos que no están bien definidos, establece si el ARN mensajero sirve como plantilla para la replicación viral o si es envuelto para ser utilizado en el ensamblaje de un nuevo virión. NS2B (14 kDa) es un cofactor de la proteasa NS3 (Huang et al., 2011). La NS3 (69 kDa) es una proteína multifuncional, bien caracterizada de actividad catalítica, involucrada en funciones de trifosfatasa y helicasa durante la síntesis de ARN viral y protección respectivamente (Bollati et al., 2010). La NS4A (16kDa) es una proteína integral hidrófoba que está involucrada en la formación de vesículas. La NS4B (30 kDa) es supresora de la señal del interferón beta e interferón gamma (Miller et al., 2007). La NS5 (105 kDa) es la única que tiene actividad polimerasa y transcripción de ARN, bloqueo de interferón y metiltransferasa involucrada en la protección del ARN viral (Kroschewski et al., 2008).

Transmisión y características de los vectores del dengue

El ciclo de transmisión selvático del virus del dengue tiene lugar en áreas selváticas de Sudeste Asiático y África Occidental y se transmite por medio de los vectores *Aedes luteocephalo*, *Aedes furcifer*, *Aedes taylori* y *Aedes niveus* donde los primates no humanos son los huéspedes de amplificación y reservorio del virus (Diallo et al; 2003). En la actualidad los cuatro genotipos del virus del dengue están ampliamente distribuidos en zonas domésticas y peri-domésticas de los trópicos, en un ciclo de transmisión humana por medio de la picadura de los mosquitos hembra del género *Aedes*, principalmente *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus* (Gubler, 2002). El mosquito *Aedes aegypti* habita comúnmente áreas

urbanas de zonas tropicales, lo que le permite estar estrechamente relacionado con el humano, considerándose un vector altamente domesticado. *Aedes aegypti* se alimenta principalmente de humanos y su adaptación le ha permitido reproducirse y desarrollarse en recipientes de agua artificiales, mientras que *Aedes albopictus* es un vector que habita principalmente zonas rurales y periurbanas, alimentándose del hombre y otros animales domésticos y silvestres (Powell and Tabachnick 2013; Murray et al., 2013; Gubler, 2014).

La transmisión transovárica o transmisión vertical en zonas endémicas del virus, podría ser la pieza clave del mantenimiento del virus del dengue en periodos inter epidémicos (Angel and Joshi, 2008). La transmisión no vectorial ha sido reportada como resultado de accidentes de laboratorio, transfusión sanguínea, trasplante de médula ósea o trasplante de órganos, sin embargo, este tipo de transmisión es más probable en zonas no endémicas de la enfermedad, situación que puede estar relacionado a algún viajero que regresa de una zona endémica (Chen and Wilson, 2016).

Las condiciones ambientales óptimas para el desarrollo de *Aedes aegypti* incluyen una temperatura entre 20 y 35 °C (Morin et al., 2013). El incremento en la temperatura beneficia el proceso de desarrollo de los mosquitos en un fenómeno conocido como período de incubación extrínseco y que beneficia la transmisión del dengue (Ciota et al., 2019), mientras que en climas fríos prácticamente se detiene el desarrollo y actividad del mosquito, así como el periodo de incubación extrínseco del virus dentro de *Aedes aegypti* (Vezzani et al., 2004, Eisen et al., 2014), mientras que el vector *Aedes albopictus* soporta mejor ambientes con bajas temperaturas (Rey and Lounibus, 2015).

El mosquito sano del género *Aedes aegypti* o *Aedes albopictus* se infecta del virus del dengue, cuando se alimenta de un humano infectado en la fase de viremia de la enfermedad. Durante el periodo de incubación extrínseca, el virus infecta primero las células del intestino medio y luego se disemina para replicarse en múltiples tejidos, infectando finalmente las glándulas salivales entre 5-12 días después, en un proceso que está influenciado por la temperatura ambiente, el genotipo viral y la competencia del mosquito. Una vez que las glándulas salivales son infectadas, el mosquito se vuelve infeccioso y capaz de transmitir el virus a otra persona durante la siguiente alimentación con sangre, el cual será portador del virus y podrá o no manifestar un cuadro clínico de la enfermedad (Gubler, 2014). El mosquito sigue siendo infeccioso de por vida y puede infectar a todas las personas de las que se alimenta (OMS/TDR, 2009).

La eficiencia de la transmisión del virus del dengue depende en buena medida de una carga viral alta presente en la sangre ingerida del hospedero portador para que el virus del dengue se encuentre en número suficiente para sobrevivir los mecanismos de defensa del artrópodo vector y suficientes partículas virales logren atravesar las barreras del intestino medio y produzcan la infección primaria y posterior desplazamiento y replicación en los tejidos de las glándulas salivales (Scott et al., 1990; Turell et al., 2006). El microbioma del intestino medio del mosquito vector juega un papel importante en la diseminación y transmisión de bacterias patógenas, parásitos o arbovirus, esto debido a que la presencia de bacterias en el intestino medio altera los mecanismos de inmunidad innata del vector o modulan su metabolismo, lo que puede influir en la transmisión del virus (Hilgenboecker et al., 2008).

Epidemiología

La enfermedad producida por el virus del dengue es un problema de salud pública en países de regiones tropicales y subtropicales, sin embargo, el dengue se ha extendiendo continuamente a nuevas áreas geográficas (OMS, 2012, Cucunawangsih y Lugito, 2017), lo anterior, debido a factores como el comportamiento humano (expansión geográfica), factores ecológicos (cambio climático, adaptación del vector) y factores virales (evolución viral) que conforman un ambiente óptimo para el desarrollo adecuado del vector y el virus (Chen y Vasilakis, 2011), lo que trae como consecuencia un incremento en la incidencia del dengue, las epidemias y aumenta la probabilidad de que se presenten formas más graves de la enfermedad producida por el virus del dengue (Murray et al., 2013), lo cual se encuentra estrechamente relacionado con la co-circulación de más de un genotipo del virus del dengue en la misma región (Secretaría de Salud, 2021).

Situación epidemiológica de dengue a nivel mundial

En los últimos años se ha registrado un incremento en la incidencia del dengue en todo el mundo. Debido a que el dengue es una enfermedad que puede presentarse de manera asintomática o con síntomas leves, sumado a las limitantes para establecer el diagnóstico de la enfermedad, se estima que el número real de casos de dengue es superior al notificado (Waggoner et al., 2016). Actualmente la enfermedad es endémica en más de 100 regiones alrededor del mundo, siendo la región de las Américas, Asia Sudoriental y el Pacífico Occidental los mayormente afectados (OMS, 2022).

El número de casos de dengue notificados a la OMS alrededor del mundo se ha multiplicado considerablemente durante las dos últimas décadas, pasando de 505,430 casos en el año 2000 a más de 2.4 millones de casos en 2010 y 5.2 millones en 2019, siendo este el año que se registraron el mayor número de casos a nivel mundial. En 2020 y 2021, el número total de casos parece haber disminuido, así como las muertes notificadas, sin embargo, no se cuenta con cifras exactas, debido a que la pandemia por COVID-19 obstaculizó la notificación de casos en las distintas regiones (OMS, 2022).

Situación del dengue en América

En la región de América, el dengue es la arbovirosis que causa el mayor número de casos, con epidemias que ocurren de manera cíclica cada 3 a 5 años (OPS, 2021), el número de casos notificados en el año 2000 fue de alrededor de 400,000 (OMS, 2022), mientras que, en el año 2013, se registró un brote epidémico con 2.3 millones de casos notificados de los cuales 37,898 fueron reportados como dengue grave y se presentaron 1,318 muertes (OPS, 2014). Así mismo, se reportó la circulación simultánea de los cuatro serotipos del virus del dengue en 11 países de la región de América. En el año 2019 se reportó el mayor número de casos con 3.1 millones de casos de dengue, de los cuales, 28,203 fueron reportados como dengue grave y se notificaron 1,773 defunciones. En el año 2021 se reportaron alrededor de 20,368 casos de infección por el virus del dengue en la región de América, donde Nicaragua reportó el mayor número de casos con 4,297, seguido de Colombia con 4,118 casos, Paraguay con 3,790 casos; mientras que en México y Ecuador se reportaron 1,951 y 1,670 casos, respectivamente (OPS, 2021).

La región de América Latina se encuentra permanentemente afectada por *Aedes aegypti*, favoreciendo la transmisión del dengue gracias a la compatibilidad para el vector con el clima tropical y a la circunstancia de que frecuentemente, los recursos para personal de salud e infraestructura médica, así como los programas de control de vectores se encuentran limitados (Rodríguez-Morales et al., 2016; Lippi et al., 2019).

Situación epidemiológica del dengue en México

El dengue sigue presentando un patrón cíclico, donde aproximadamente cada 5 años ocurre un incremento en el número de casos debido principalmente a la introducción de una nueva cepa/serotipo del virus del dengue, seguido de un periodo de disminución de casos (OPS, 2021). En México, se presentaron brotes producidos por el virus del dengue en los años 2007, 2009, 2012 y 2013. A partir del año 2014 y hasta 2018 se presentó un periodo con una reducción en los casos de dengue con un total de 11, 593 casos confirmados con 7, 972 como dengue no grave, 2, 823 reportados como dengue con signos de alarma y 798 como dengue grave, sin embargo, recientemente en 2019, se presentó un nuevo brote epidemiológico por el virus el dengue en México, dando como resultado que para el periodo comprendido de 2000 a 2019 se presentaron más de 518,000 casos confirmados por dengue (Arredondo- García et al., 2020).

Respuesta inmune celular

La respuesta inmune celular mediada por las células T CD8+ y CD4+, es uno de los componentes más importantes en la inmunidad específica contra el

virus del dengue (Rothman, 2011), con una respuesta sólida contra las proteínas virales, particularmente contra los epítomos de NS3 (Duangchinda et al., 2010). Diversos estudios *in vitro* han proporcionado evidencia de que la respuesta inmune mediada por células T en una infección secundaria heteróloga por el virus del dengue, pueden causar un fenómeno llamado pecado antigénico original, el cual consiste en la activación de células T de menor avidéz por el genotipo infectante, pero reaccionan mejor contra genotipos previamente infectantes (Mathew and Rothman, 2008). Durante una infección primaria, se producen células T y células T de memoria de reacción cruzada. Al producirse la infección secundaria con un genotipo heterólogo, las células T CD8+ altamente reactivas con avidéz por la infección secundaria por el virus del dengue se activan masivamente e inducen una gran producción de citoquinas proinflamatorias y antiinflamatorias como IFN- γ TNF- α , IL-13, y en menor cantidad IL-10. Además, se expanden los linfocitos T CD8+ de baja avidéz que producen reactividad cruzada. Las células T CD8+ de reactividad cruzada contra genotipos heterólogos pueden perder su actividad citolítica (Martina, 2009). Esto puede retrasar la eliminación del virus del dengue, prolongar la activación de las células T CD8+ de reactividad cruzada e inducir un alto nivel de citoquinas proinflamatorias y otros factores solubles. En conjunto, estos factores afectan a la permeabilidad vascular, lo que conduce a una mayor incidencia de dengue grave (Mongkolsapaya et al., 2003).

Respuesta humoral y respuesta dependiente de anticuerpos

La patogenia de la infección por el virus del dengue y las manifestaciones graves del dengue es muy compleja y no se comprende por completo (Sellahewa, 2013), la interacción de varios factores, como el genotipo viral, los antecedentes genéticos del huésped, la respuesta inmunitaria a infecciones previas por dengue, influyen mucho en el resultado y la gravedad de la enfermedad (Dussart et al., 2012, Halstead, 2019).

La respuesta inmune celular juega un papel muy importante en el control de la infección por el virus del dengue, la cual genera una respuesta rápida y potente, principalmente contra la proteína E, prM y las proteínas no estructurales NS3, NS5 y NS1 (Valdes et al., 2000). La infección primaria por un genotipo proporciona una inmunidad de por vida contra ese genotipo específico, pero sólo inmunidad transitoria contra otros genotipos (Endy et al., 2004). La reinfección o segunda infección por un genotipo heterogéneo, puede dar lugar a manifestaciones clínicas más graves, como fiebre hemorrágica del dengue y el síndrome de choque por dengue. Debido a una respuesta dependiente de anticuerpos (ADE), que es causado cuando el virus de una infección secundaria es reconocido por anticuerpos (IgG), pero no neutralizado, por anticuerpos generados en la infección previa por un genotipo distinto, los cuales a su vez facilitan su internalización en las células diana del DENV (monocitos, macrófagos y células dendríticas) usando el receptor Fcγ (Mathew and Rothman, 2008, Guzmán et al., 2013, Cáceres et al., 2019). Esto puede llegar a presentarse en niños lactantes que han recibido inmunidad pasiva de la madre (García-Campos et al., 2010). Se cree que se debe a la reacción cruzada de los anticuerpos

específicos dirigidos contra la proteína E y la prM que contribuyen al desarrollo de la enfermedad grave del dengue al facilitar el aumento de la infección dependiente de anticuerpos (Da Silva et al., 2012), esto debido a que los anticuerpos específicos de reacción cruzada de la proteína E, al superar cierto umbral de concentración son capaces de brindar protección, pero con el paso del tiempo, disminuye la concentración, volviendo al individuo susceptible de la infección con otros genotipos del virus (Whitehorn y Simmons, 2011). Mientras que estudios *in vitro* han demostrado que los anticuerpos anti-prM de reacción cruzada con otros genotipos del dengue, incluso en concentraciones altas no logran neutralizar el virus del dengue, pero sí pueden potencializar la ADE (Dejnirattisai et al., 2010, Beltramello et al., 2010). La proteína NS1 se considera responsable de la mayoría de las características fisiológicas del dengue grave (Halstead et al., 2019), de igual manera se ha demostrado que la reacción inmunológica generada por la presencia del anticuerpo específicos anti-NS1 está involucrado en la patogenia del virus, debido a la liberación exacerbada de citosinas y quimiocinas por parte del endotelio celular (Bhatt et al., 2021).

Métodos convencionales para la detección del virus del dengue

Un diagnóstico ideal para el virus del dengue debe ser rápido, simple, de alta sensibilidad y especificidad, de preferencia capaz de diferenciar entre una infección primaria y una secundaria (Peeling et al., 2010). El dengue puede diagnosticarse por medio de los signos clínicos de la enfermedad, sin embargo, las manifestaciones clínicas fácilmente se pueden confundir con otras

enfermedades infecciosas como leptospirosis, malaria, influenza, chikungunya y fiebre tifoidea entre otras (Hunsperger et al., 2016); por lo tanto, es de suma importancia la confirmación por medio de métodos diagnósticos de laboratorio (Muller et al., 2017). Los métodos convencionales para la detección del virus del dengue por laboratorio se basan en pruebas serológicas que detectan anticuerpos específicos tipo IgM e IgG o el antígeno viral NS1, y también por medio de pruebas moleculares a través de reacción de cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR) (Rafaat et al., 2019, Kabir et al., 2020). La elección del método diagnóstico depende de la etapa clínica del paciente con dengue, la identificación del antígeno NS1 y las pruebas moleculares como los RT-PCR, son recomendadas durante la etapa febril cuando el paciente es virémico, las pruebas serológicas son utilizadas a partir de que la viremia desciende ya que coincide con la posibilidad de detectar anticuerpos específicos del dengue (Halstead, 2007, Andries et al., 2015).

Diagnóstico clínico

Con el propósito de establecer criterios clínicos uniformes y más sencillos que proporcionen un enfoque global estandarizado para la clasificación de la enfermedad, en 2009, la Organización Mundial de la Salud (OMS) modificó los criterios para el manejo clínico del dengue y las clasificaciones existentes de la infección por este virus, sustituyendo al cuadro de Fiebre hemorrágica y el Síndrome de choque como dengue con o sin signos de alarma y dengue grave (OMS/TRD, 2009) (Cuadro 1).

Cuadro 1. Criterios clínicos para la clasificación del dengue en humanos.

Dengue sin signos de alarma	Dengue con signos de alarma	Dengue severo
<p>Probable dengue:</p> <p>Vivir o haber viajado a áreas de dengue epidémico.</p> <p>Fiebre más 2 de los siguientes criterios:</p> <ul style="list-style-type: none"> ● Náuseas ● Vómito ● Sarpullido ● Achaques ● Positivo a la prueba del torniquete ● Leucopenia ● Cualquier signo de alarma 	<p>Con signos de alarma:</p> <p>Requiere observación y atención médica.</p> <ul style="list-style-type: none"> ● Sensibilidad o dolor abdominal ● Vómito persistente ● Sangrado de mucosas ● Letargia, inquietud ● Agrandamiento de hígado (2cm) ● Acumulación de líquido <p>Laboratorio: aumento del hematocrito concurrente con una rápida disminución del recuento plaquetario.</p>	<p>1. Pérdida grave de plasma que conduce a:</p> <ul style="list-style-type: none"> ● Choque ● Acumulación de fluidos con distrés respiratorio. <p>2. Sangrado severo</p> <p>3. Afectación severa de órganos:</p> <ul style="list-style-type: none"> ● Daño hepático importante (AST o ALT \leq 1000 IU/L) ● SNC: consciencia alterada ● Corazón y otros órganos

(Adaptado de OMS, 2009).

Se debe considerar al dengue como posible causa de enfermedad en un paciente con una sintomatología clínicamente compatible, que vive o ha viajado recientemente a una zona endémica de la enfermedad dentro de las dos semanas anteriores a la aparición de los síntomas. Todos los pacientes con sospecha clínica de dengue deben recibir un tratamiento adecuado para reducir

el riesgo de complicaciones derivadas del aumento de la permeabilidad vascular, la fuga de plasma y el daño generalizado de órganos, sin esperar a recibir los resultados de las pruebas de diagnóstico (CDC, 2021).

Diagnóstico serológico

Las pruebas serológicas son utilizadas ampliamente sobre todo en zonas endémicas de la enfermedad y en países con recursos limitados, ya que son económicas y fáciles de manejar. Las pruebas más utilizadas actualmente son las ELISA, para la detección anticuerpos IgM e IgG, el antígeno no estructural (NS1), así mismo en los últimos años se han desarrollado pruebas de diagnóstico rápido, se utilizan comúnmente para la detección de DENV debido a su simplicidad y rapidez (Parkash y Shued, 2015, Blacksell, 2012). Las pruebas diseñadas para detectar el antígeno NS1, específico del dengue o los anticuerpos tipo IgM, se encuentran entre los métodos de diagnóstico más comunes utilizados para la detección de la infección por el virus del dengue (Parkash y Shued, 2015). Las pruebas de flujo lateral son rápidas y tardan entre 10 y 30 minutos en completarse, aunque tienen menor sensibilidad y especificidad que las pruebas ELISA y muestran reactividad cruzada con otros flavivirus (Suzuki et al., 2017). Por otra parte, los sistemas ELISA requieren equipos costosos para su análisis y automatización (Liu et al., 2020).

Pruebas ELISA basadas en IgM

Durante una primera infección por dengue, la IgM es la primera en aparecer, se produce cinco días después de presentar síntomas y alcanza su pico máximo

aproximadamente dos semanas después, puede persistir en circulación de 2 a 3 meses, durante una segunda infección los niveles de IgM se mantienen bajos, mientras que los niveles de IgG se elevan (OMS/TDR, 2009, Chanama et al., 2004). Generalmente, las pruebas ELISA disponibles comercialmente que detectan anticuerpos tipo IgM muestran niveles de sensibilidad que van desde 61.5 – 99.0% y niveles de especificidad entre 79.9 – 97.8%. Las pruebas de flujo lateral reportan niveles de sensibilidad más bajas que van de 20.5 al 97.7% y niveles de especificidad del 76.6 al 90.6%. Las principales desventajas de las pruebas que detectan anticuerpos tipo IgM son su reactividad cruzada y la incapacidad para identificar el serotipo viral específico (Hunsperger et al., 2009).

Pruebas ELISA basadas en NS1

El antígeno no estructural NS1 juega un papel importante en la replicación del DENV en la célula huésped. El antígeno se produce y se descarga en el torrente sanguíneo de los pacientes infectados y es considerado como un biomarcador esencial para detectar la infección por flavivirus en etapas tempranas (Chan et al., 2017; Kabir et al., 2020). Actualmente, existen al menos siete pruebas para detectar el antígeno NS1 disponibles comercialmente y cuatro de ellas son pruebas rápidas (Pal et al., 2014; Trojanek et al., 2016). Las siete pruebas son: *Dengue NS1 Ag STRIP (BioRad, Marnes-la-Coquette, Francia)*, *Platelia Dengue NS1 Ag ELISA (BioRad)*, *Dengue NS1 Detect Rapid Test (InBiosInternational)*, *DENV Detect NS1 ELISA (InBios International)*, *Panbio Dengue Early Rápido (Alere, Waltham, WA, EUA.)*, *Panbio Dengue Early ELISA (2ª generación (Alere)*

y prueba rápida *SD Bioline Dengue NS1 Ag* (Abbott, Abbott Park, IL, EUA.) (Blacksell et al., 2012; Pal et al., 2014).

El dispositivo *Detect NS1 ELISA* (InBios International) es el único producto aprobado por la FDA (*Food and Drug Administration*) en el mercado y reporta una sensibilidad del 95.9%, lo que lo convierte en el producto superior entre sus pares (89.4% de *BioRad* y 85.6% de *Panbio*) (Anderson et al., 2014), así como una especificidad de 100% (Gaikwad et al., 2017).

Pruebas ELISA basadas en IgG

Los anticuerpos específicos del dengue tipo IgG, durante la primera infección se incrementan lentamente, apenas son apreciables al final de la primera semana después de presentarse los síntomas, en el caso de una segunda infección, los niveles de IgG se incrementan drásticamente y pueden ser detectables incluso en la fase aguda (OMS/TDR, 2009). Blacksell et al. (2012), realizaron un estudio comparativo de siete sistemas ELISA comerciales, entre las cuales se encontraban las dirigidas contra IgG, de las compañías *Standard Diagnostics* (Seúl, Corea del Sur) y *Panbio Inc.* (Brisbane, Australia ahora *Alere Inc.*, Waltham, WA, EE. UU.). Obteniendo como resultados una sensibilidad del 81.2% y 63.5% y especificidad del 39.8% y 95.3% respectivamente. Se concluyó que las pruebas que detectan IgG no son suficientes para establecer un diagnóstico en la etapa temprana de la enfermedad, comprobando que la ELISA que detecta anticuerpos tipo IgM y la proteína NS1 del virus del dengue son más útiles para establecer el diagnóstico de una infección aguda.

Existen además otros dispositivos ELISA que detectan anticuerpos tipo IgG de empresas como *Inbios* (Seattle, WA, EE. UU.), *Abcam* (Cambridge, MA, EE. UU.) y *Euroimmum* (Lübeck, Alemania). En un estudio donde se comparó el desempeño de estos dispositivos se observó que las pruebas que detectan anticuerpos tipo IgG tenían una alta tasa de falsos positivos y una alta reactividad cruzada (Lee et al., 2019). Debido a la reactividad cruzada con otros anticuerpos IgG producidos contra distintos flavivirus, es difícil determinar un caso de enfermedad empleando sólo pruebas basadas en la detección de anticuerpos tipo IgG (Calvert et al., 2018).

Pruebas basadas en la amplificación de ácidos nucleicos

Las pruebas de amplificación de ácidos nucleicos (NAAT), son pruebas moleculares que requieren de la extracción de ácidos nucleicos de las muestras, sus resultados pueden ser tanto cuantitativos como cualitativos y pueden utilizarse para la serotipificación del virus, presentan mayor precisión y sensibilidad que las pruebas serológicas, lo que permite una detección de la infección en fase aguda (Kabir et al., 2021).

Pruebas basadas en la detección de técnicas de reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR)

En la actualidad, los métodos moleculares encuentran amplias aplicaciones en el diagnóstico e investigación de virus patógenos, siendo el método de PCR uno de los métodos más utilizados (Artika et al., 2020). La invención de la técnica de

PCR revolucionó el mundo de la biología molecular y es hasta la fecha una herramienta fundamental en laboratorios de investigación (Rathakrishnan y Sekaran, 2013). La evolución de la técnica de PCR convencional dio lugar a el desarrollo de la técnica RT-PCR, reacción en cadena de la polimerasa cuantitativo (q-PCR) y RT-PCR/q-PCR combinados (Singh et al., 2014).

Con la incorporación de la transcriptasa reversa (RT), fue posible la transcripción del ARN viral obtenido de muestras de sangre, plasma, orina y suero a ADN complementario (ADNc) seguido de la amplificación (Rathakrishnan y Sekaran, 2013). Una de las técnicas más utilizadas en el diagnóstico del dengue era la de PCR anidado, la cual inicia con la transcripción inversa y amplificación utilizando cebadores de una región conservada del genoma del virus del dengue, seguida de la segunda etapa que es la de amplificación utilizando un cebador específico de cada genotipo del dengue, los productos de la reacción son separados por electroforesis, lo que permite diferenciar entre los genotipos del virus del dengue (Lanciotti et al., 1992, Guzmán et al., 2010).

Pruebas de reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real o reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa

La técnica RT-PCR fue considerada la prueba de oro para la detección de ácidos nucleicos de una variedad de patógenos, sin embargo, el desarrollo de la técnica de PCR en tiempo real tuvo mejor aceptación debido a sus niveles de sensibilidad, rapidez y el menor riesgo de contaminación (Mackay et al., 2002, Wang and Gubler, 2018). El PCR en tiempo real es una técnica que se utiliza

para medir cuantitativamente las cantidades iniciales de ADN, ADNc o ARN de una muestra, es un proceso que se lleva a cabo en un solo paso, eso quiere decir que el análisis se lleva a cabo al mismo tiempo de la reacción, esto se logra gracias a los fluoróforos que reaccionan con el producto de amplificación y hacen posible su medición con un instrumento (VanGuilder et al., 2008).

Actualmente se han diseñado distintas plataformas de RT-PCR para la detección y la genotipificación de DENV, pero solo hay dos plataformas que recientemente han sido aprobadas por la FDA: el ensayo multiplex de RT-PCR en tiempo real CDC DENV 1-A y el Tríplex RT-PCR (Santiago et al., 2013; Santiago et al., 2018).

El ensayo múltiple CDC DENV-1-4 RT-PCR en tiempo real es utilizado para la detección e identificación de los cuatro genotipos del virus del dengue de muestras de suero y plasma de pacientes que presentan signos y síntomas compatibles con la infección por dengue. El ensayo multiplex CDC DENV-1-4 RT-PCR en tiempo real se puede ejecutar de forma separada o en formato multiplex, ambos formatos proporcionan la misma sensibilidad (CDC, 2021).

Santiago et al., (2013) realizaron un estudio retrospectivo con 102 casos de dengue confirmados por seroconversión de anticuerpo tipo IgM anti-DENV en muestras de pacientes convalecientes, el ensayo RT-PCR detectó ARN de DENV en el 98.04% de las muestras agudas. Utilizando la secuenciación como indicador positivo, el ensayo RT-PCR tuvo una concordancia positiva del 97.92% en 86 pacientes con sospecha de dengue con una sola muestra de suero agudo y una concordancia negativa del 100%. Después de extensas validaciones, el

rendimiento del ensayo RT-PCR, no produjo resultados falsos positivos para agentes etiológicos de otras enfermedades febriles y no se vio afectado por niveles patológicos de biomoléculas potencialmente interferentes. Estos resultados indican que el ensayo CDC DENV-1–4 RT-PCR proporciona una plataforma de diagnóstico confiable capaz de confirmar el dengue en casos sospechosos.

Alm et al., (2015) realizaron un estudio donde describieron y validaron ensayos de RT- PCR en tiempo real para cada genotipo en una sola reacción y su rendimiento se comparó con el ensayo CDC DENV 1-4 RT-PCR con 85 muestras de pacientes que presentaban dengue agudo. Obtuvieron como resultado que los ensayos RT-PCR eran específicos para cada genotipo y mostraron reacción cruzada contra otros flavivirus, además, de las 85 muestras confirmadas con dengue agudo se obtuvo el 100% de concordancia positiva con la de CDC DENV 1-4 RT-PCR en formato *singleplex*, con lo cual concluyeron que los ensayos RT-PCR son una alternativa a métodos ya existentes para la genotipificación del virus del dengue.

La co-circulación de diferentes flavivirus en una sola área geográfica aumentó la urgencia de un nuevo ensayo capaz de detectar múltiples virus al mismo tiempo sin empeorar el rendimiento diagnóstico (Cleton et al., 2015). Como respuesta a los desafíos de diagnóstico presentados por la epidemia del virus del Zika (ZIKV), los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC) desarrollaron el ensayo Trioplex RT-PCR en tiempo real para la detección simultánea de ARN del virus ZIKV, DENV y Chikungunya

(CHIKV) en suero humano, o en sangre completa en ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) (Santiago et al., 2018).

En un estudio realizado por Colombo et al., (2019) se analizó el rendimiento diagnóstico del ensayo de RT-PCR en tiempo real Trioplex para determinar la sensibilidad, especificidad y precisión del método. El método multiplex mostró que la prueba presenta una sensibilidad del 95% y una especificidad del 100%, por lo que se concluyó que el ensayo Trioplex es de gran utilidad para el diagnóstico con precisión de casos de dengue.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El dengue es una enfermedad viral, epidémica, transmitida principalmente por mosquitos *Aedes aegypti*. Actualmente, el dengue es la enfermedad transmitida por artrópodos más importante a nivel mundial en términos de morbilidad e impacto económico, sobre todo en países en desarrollo (Harapan et al., 2020). Los primates, incluido el hombre, son el hospedero principal del virus del dengue donde mantiene un ciclo epidémico, pero se desconoce si este virus es capaz de transmitirse, replicarse y mantenerse entre las distintas especies animales que conviven con el hombre (Gwee et al., 2021). A la fecha no existe en nuestro medio evidencia científica que confirme la presencia del dengue, ni estudios sobre la competencia del virus en estas especies. En Baja California, la Secretaría de Salud ha notificado casos de dengue desde el año 2015, sin embargo, se carece de evidencia científica sobre la presencia de *Aedes aegypti* en la zona de Mexicali, Baja California, no obstante que investigaciones realizadas en San Luis Río Colorado, Sonora y el sur del estado de California, EUA, han reportado la presencia de *Aedes aegypti* (Jones et al., 2016; Pless et al., 2022). Por lo anteriormente expuesto, surge la necesidad de identificar y clasificar las especies de mosquitos presentes en nuestro medio para confirmar la presencia de *Aedes aegypti* y/o *Aedes albopictus*, principales vectores del dengue, y posteriormente probarlas bajo RT-PCR para realizar la detección el virus.

JUSTIFICACIÓN

Los cuatro serotipos del dengue producen una de las enfermedades transmitidas por artrópodos más importantes de distribución mundial que afectan al hombre. El virus es transmitido principalmente por mosquitos del género *Aedes*. Factores como el crecimiento de la población, la urbanización, el cambio climático y la domesticación de sus vectores han favorecido la propagación de la enfermedad (OMS, 2022). Se sabe que los primates, incluyendo el hombre, son los principales hospederos del virus del dengue, sin embargo, no existe en nuestro medio evidencia científica sobre la capacidad del virus de replicarse y mantener el ciclo infeccioso en otras especies animales. Recientemente se ha reportado evidencia de infección por virus del dengue en aves, bovinos, equinos, porcinos, roedores, caninos y otros animales, sin embargo, se requieren de más estudios en diferentes especies animales para comprender mejor el papel que juegan como potenciales reservorios en la transmisión de esta enfermedad (Gween et al., 2021).

En Baja California no se cuenta con evidencia científica que confirme la presencia de las especies de mosquitos *Aedes aegypti* o *Aedes albopictus*, en la zona de Mexicali. Este proyecto beneficiará al sector salud al generar información científica sobre la presencia del vector, el virus del dengue, con lo cual se podrán diseñar e instrumentar medidas epidemiológicas más adecuadas para su control, beneficiando indirectamente a la población de Mexicali.

OBJETIVOS

Objetivo general

Determinar la presencia del virus del dengue en mosquitos *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus* en Mexicali, Baja California, México.

Objetivos específicos

- Capturar e identificar taxonómicamente mosquitos del género *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus*, capturados en Mexicali, Baja California, México.
- Diseñar, estandarizar e instrumentar una plataforma molecular de reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real de transcripción reversa que amplifica un fragmento homólogo del gen NS5 (RdRp) presente en los cuatro genotipos del virus del dengue.
- Utilizar la plataforma de reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real de transcripción reversa para amplificar el ARN del virus del dengue a partir de muestras de mosquitos presentes en Mexicali, Baja California, México.
- Identificar la distribución del dengue por sectores en Mexicali, Baja California.

MATERIALES Y MÉTODOS

Diseño del estudio

Se realizó un estudio epidemiológico de tipo transversal en la ciudad de Mexicali, Baja California, México. Se muestrearon mosquitos *Aedes aegypti*, y *Aedes albopictus*, fueron clasificados y sexados, para posteriormente analizar las hembras y detectar Dengue. Todos los análisis se realizaron en el Laboratorio de Serología del Instituto de Investigaciones en Ciencias Veterinarias (IICV) de la Universidad Autónoma de Baja California (UABC), ubicado en la carretera Mexicali-San Felipe Km 3.5, Laguna Campestre, Mexicali, BC, México.

Duración del estudio

Las etapas de trabajo de campo, clasificación taxonómica y morfológica de los mosquitos capturados, procesamiento de muestras y ejecución de pruebas de laboratorio se realizaron en el periodo comprendido de los meses de enero a octubre de 2023.

Lugar de toma de muestra

Se realizaron colectas de mosquitos en 4 cuadrantes (noroeste, suroeste, noreste y sureste) de Mexicali, Baja California. Los cuadrantes están divididos horizontalmente por el boulevard Adolfo López Mateos y verticalmente por el boulevard Lázaro Cárdenas. El cuadrante del noreste está delimitado hasta la calzada Heroico Colegio Militar, el noreste abarca hasta la calle Novena, el

suroeste hasta la calzada Laguna Xochimilco y hacia el sur hasta la carretera San Felipe y el sureste va hasta el fraccionamiento Condesa (Figura 2).

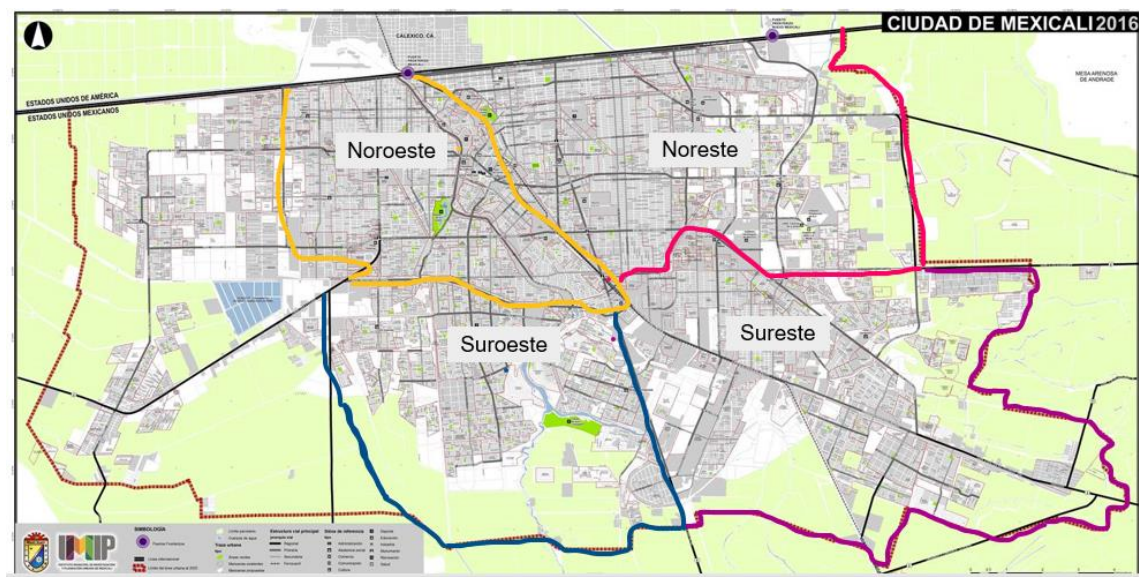


Figura 2. Cuadrantes de muestreo de mosquitos.

Criterios de inclusión y de exclusión

Se estableció como criterio de inclusión todo mosquito que sea identificado y clasificado morfológicamente como hembra de las especies *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus* como objeto de estudio para este proyecto.

Tamaño de muestra

Se realizó un muestreo por conveniencia donde se llevaron a cabo al menos 3 muestreos en los cuadrantes seleccionados de Mexicali, Baja California. Obteniendo un total de 4161 mosquitos, siendo 545 *Aedes aegypti* y ningún mosquito *Aedes albopictus*.

Metodología

Captura y clasificación de mosquitos

Se realizó la captura de mosquitos en los cuadrantes establecidos en el Municipio de Mexicali, Baja California. Los sitios seleccionados para muestrear se caracterizan por estar dentro de la zona urbana, puntos cercanos a áreas verdes y fuentes de agua lo que propicia a un ambiente ideal para un criadero de mosquitos. La colecta se realizó una vez por mes en los diferentes puntos de colecta, de enero a octubre de 2023. La captura se realizó mediante el uso de una red de malla fina para uso entomológico, la cual se utilizó para capturar mosquitos que se encontraban entre el pasto alto o volando, moviendo la red de lado a lado en repetidas ocasiones (INDRE, 2009) y mediante la técnica de sebo humano, la cual consiste en la exposición desnuda desde las rodillas para abajo, con la intención de que el mosquito se pose para alimentarse, una vez que se sienta la presencia del mosquito, para realizar su captura se requiere la ayuda de un tubo colector (Secretaria de Salud, 2020). Los mosquitos capturados fueron clasificados por especie y sexo siguiendo las metodologías para clasificación morfológica descritas por Rueda (2004) y por Ramberg (2017), donde mencionan las características claves para identificar al vector *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus*. Para fines de este estudio, se seleccionaron solo las hembras de *Aedes aegypti* o *Aedes albopictus*. Posterior a su clasificación, se realizó una selección de los ejemplares mejor conservados (que su anatomía esté en óptimas condiciones), finalmente se agruparon en 11 grupos totales (4 mosquitos por grupo de la misma zona), en total se obtuvieron 4 grupos para el Noroeste, 2 Sureste, 3 Suroeste y 2 para el Noreste). Los tubos con los mosquitos

seleccionados para el estudio, fueron almacenados a -20°C hasta el momento del procesamiento para extracción de ARN.

Extracción de ARN de mosquitos

La extracción de ARN se realizó utilizando la técnica descrita por Armas y colaboradores (2005); brevemente, los mosquitos son pulverizados después de ser sometidos a ultracongelación en nitrógeno líquido por 3 minutos, reconstitución en 500 µl de agua grado biología molecular y repetición del procedimiento por un total de tres veces. Posteriormente, las muestras son centrifugadas a 12,000 rpm para obtener un sobrenadante clarificado que contiene al virus. Se utilizaron 200 µl del sobrenadante clarificado para la extracción de ARN. La extracción se realizó empleando los juegos de reactivos comerciales *Aurum™ Total RNA Fatty and Fibrous Tissues Module Kit* de *Bio Rad* (Hércules, California, USA), número de catálogo 7326830. El ARN extraído fue reconstituido en un volumen final de 30 µl empleando la solución de rehidratación suministrada con los reactivos y ésta se almacenó en congelación a -20°C hasta el momento de realizar las pruebas de RT-PCR en tiempo real.

Oligonucleótidos para la secuencia de un fragmento homólogo de la NS5 polimerasa de los 4 genotipos del virus dengue

Para el diseño de los oligonucleótidos se utilizaron los programas *GeneRunner* versión 6.1, disponible en <http://www.generunner.net/> y el programa *OligoCalc* versión 3.2, disponible en: <http://biotools.nubic.northwestern.edu/OligoCalc.html>. A partir de estos

programas se diseñaron, evaluaron y seleccionaron los juegos de oligonucleótidos que cumplen con las características físicas y químicas de longitud de 20-24 nucleótidos con un contenido de GC entre 35 y 60%, manteniendo una temperatura de fusión entre 45-65 ° C, evitando repeticiones >3 nucleótidos G o C continuos, y verificando que las secuencias positiva y negativa no produzcan complementariedad y evitar la formación de dímeros u otro tipo de estructuras secundarias aberrantes.

Se utilizó la plataforma PCR en tiempo real con transcriptasa reversa para la amplificación del ARN correspondiente a la secuencia del gen NS5 de una región homóloga para los cuatro genotipos de dengue, disponibles en las bases de datos bajo los códigos DENV1: NC_001477.1, DENV2: NC_001474.2, DENV3: NC_001475.2, DENV4: NC_002640.1. La plataforma de PCR en tiempo real está diseñada para generar un producto de amplificación de 78 pares de bases (pb) empleando el oligonucleótido de banda positiva con secuencia 5'-GACTAGAGGTTAGAGGAGAC-3' y el oligonucleótido de banda negativa con secuencia 3'-AGACAGCAGGATCTCTGGTC-5' (Cuadro 2).

Los oligonucleótidos fueron sintetizados por *Synbio Technologies* (Nueva Jersey, EUA), empacados y enviados liofilizados. Los oligonucleótidos fueron reconstituidos con agua grado biología molecular. Brevemente, los tubos con el liofilizado se centrifugaron a máxima velocidad por 10 segundos; posteriormente, dentro de la campana de flujo laminar, se agrega a cada tubo 10 veces el valor de la concentración en nanomoles (nM) referida por el fabricante para obtener una concentración estándar de 100 micromolar (μM). Los tubos se mezclaron en

vortex por 30 segundos a máxima velocidad, incubados en refrigeración a 4°C por 60 minutos y mezclados nuevamente en vortex a máxima velocidad.

Cuadro 2. Características de los oligonucleótidos para un fragmento homólogo del gen de la polimerasa de los cuatro genotipos del dengue.

Gen	Oligonucleótidos	Amplicon	Tm
Dengue virus RdRp DENV1: NC_001477.1 DENV2: NC_001474.2 DENV3: NC_001475.2 DENV4: NC_002640.1	Set 1: PoIF1: 5'- GACTAGAGGTTAGAGGAGAC -3' PoIR1: 3'- AGACAGCAGGATCTCTGGTC -5'	78 nt	78.3 °C

La concentración de trabajo de los oligonucleótidos reconstituidos fue de 10 µM para lo cual se hará una dilución de la mezcla de la concentración estándar 1:10 en agua grado biología molecular y separada en alícuotas de 200 µl cada una. Las soluciones estándar y las de trabajo de los oligonucleótidos se almacenaron en congelación a -20°C hasta el momento de las pruebas de RT-PCR en tiempo real.

Estandarización para la prueba RT- PCR en tiempo real

Con el propósito de establecer las cantidades y concentraciones óptimas de reactivos para las reacciones de PCR en tiempo real se probó el juego de oligonucleótidos por triplicado a 200 nM, 400 nM y 800 nM con 1 µl, 2 µl y 3 µl de ADN template en un volumen total de reacción de 20 µl, empleando una mezcla

maestra formulada con el fluoróforo *SYBR Green* (Bio Rad, Hércules, CA, USA), una tinción fluorescente de alta afinidad para ADN de doble banda (Cuadro 3).

Protocolo para la prueba RT- PCR en tiempo real

Los extractos de ARN obtenidos de los mosquitos fueron probados por triplicado en un termociclador *Bio Rad CFX96* (*BioRad*, Hercules, Carolina, EUA). En cada corrida de RT-PCR en tiempo real se utilizaron tres controles positivos de ARN, tres controles de mezcla maestra sin ARN templete, tres controles negativos de agua grado biología molecular y tres controles negativos con aire. Los parámetros de transcripción reversa, desnaturalización, hibridación y extensión se calcularon empleando la herramienta *Protocol Autowriter* de la paquetería CFX96, tomando en consideración el tamaño del producto del PCR, la secuencia de los oligonucleótidos y el tipo de enzima de la mezcla maestra. Asimismo, para cada corrida se realizó el análisis de curva de disociación a partir de 80°C y hasta 95°C con incremento de 0.5°C para la identificación de productos de amplificación de PCR específicos para cada gen analizado y poder discriminar entre artefactos distintos a la amplificación del templete de ADN esperado.

Cuadro 3. Optimización de reactivos, concentración y volumen final para el fragmento homólogo gen polimerasa de los 4 genotipos del dengue.

Reactivo	200 nM	400 nM	800 Nm
Mezcla maestra	5.0 µl	5.0 µl	5.0 µl
Templete DNA	1-2-3 µl	1-2-3 µl	1-2-3 µl
Oligonucleótido Positivo	0.5 µl	1 µl	2 µl
Oligonucleótido Negativo	0.5 µl	1 µl	2 µl
H ₂ O	3-2-1 µl	2-1-0 µl	0-0-0 µl
Volumen final	10 µl	10 µl	10-12 µl

*El ADN templete fue agregado al final en una campana de seguridad diferente.

Los resultados de las pruebas por RT-PCR en tiempo real fueron considerados positivos cuando la muestra correspondiente logró una señal fluorescente de amplificación por encima del valor de corte que la paquetería CFX96 calculó en cada corrida en un máximo de 40 ciclos. Los resultados fueron considerados negativos cuando la muestra correspondiente no logró desarrollar una señal fluorescente de amplificación por encima del valor de corte en un máximo de 40 ciclos.

RESULTADOS

Se colectaron un total de 4,161 mosquitos en 4 cuadrantes de Mexicali de enero a octubre del 2023. Del total de moscos capturados, 545 (13.1%) fueron clasificados con éxito como *Aedes aegypti* (Figura 3), y no se encontró evidencia de mosquitos *Aedes albopictus* en estas zonas.

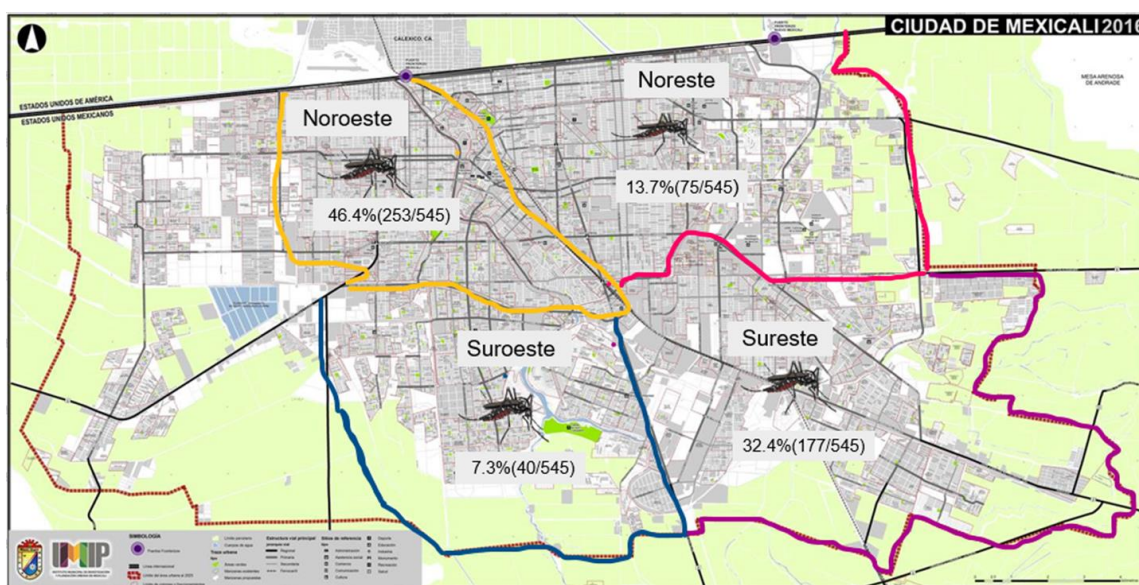


Figura 3. Mapa de la distribución de mosquitos del género *Aedes aegypti* en Mexicali, Baja California.

De todos ellos 12 (2.2%) fueron capturados durante el mes de junio, 378 (69.3%) en el mes de septiembre y 155 (28.4%) durante el mes de octubre (Figura 4). Del total de moscos identificados como *Aedes aegypti*, 436 (80%) fueron clasificados como hembras (Cuadro 4).

Cuadro 4. Mes y cuadrante donde se encontraron hembras *Aedes aegypti*.

Cuadrantes	Hembras <i>Aedes aegypti</i>		
	Junio	Septiembre	Octubre
Noroeste	0	170	31
Suroeste	10	20	0
Noreste	0	35	16
Sureste	0	110	44
Total	10	335	91

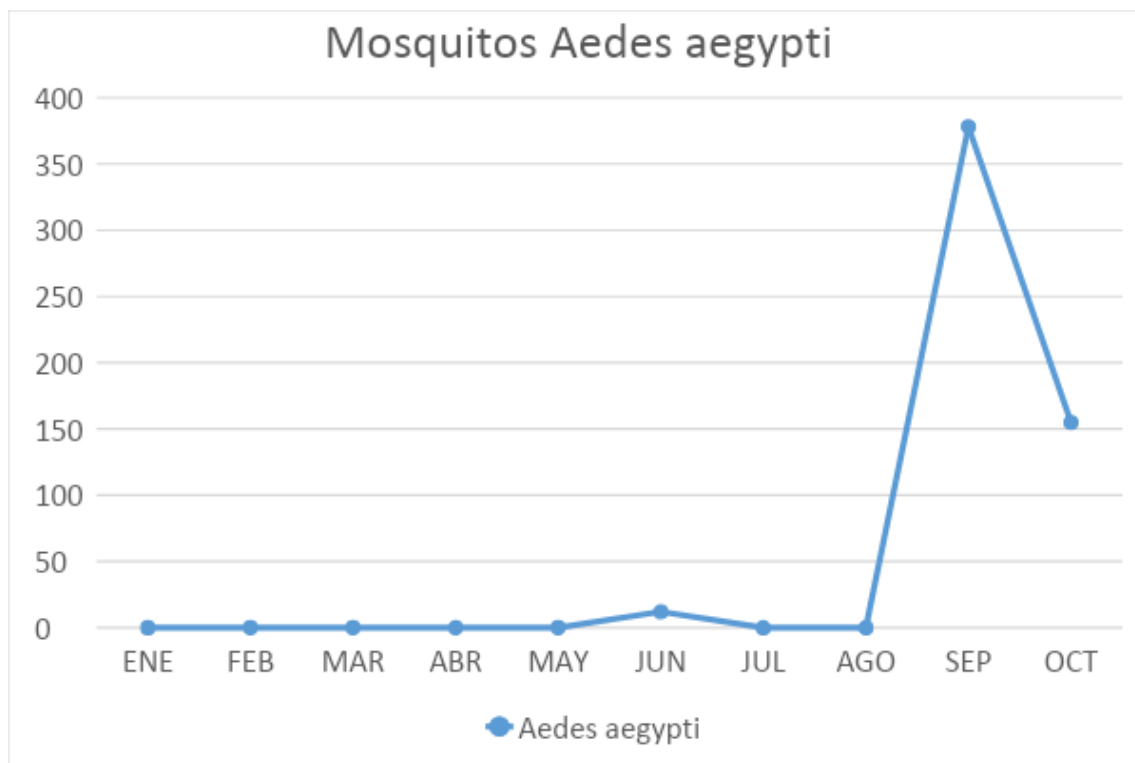


Figura 4. Cantidad de mosquitos colectados por mes.

Resultados de la estandarización del RT-PCR en tiempo real para un fragmento homólogo de la polimerasa NS5.

Los resultados de la amplificación y la curva de disociación simultáneos para NS5 demostraron que la combinación óptima de reactivos para obtener la máxima señal de amplificación en las muestras se logra mezclando los oligonucleótidos a una concentración de 400 nM con 1 µl de ADN template, aplicando un ciclo de transcripción reversa a 50°C durante 10 minutos, seguido de un ciclo de desnaturalización inicial de 95°C durante 2 minutos, seguido de 40 ciclos de 15 segundos de desnaturalización a 95 °C, 15 segundos de hibridación con una temperatura de 47.5°C y un ciclo final de extensión de 15 segundos a 72 °C (Figura 5).

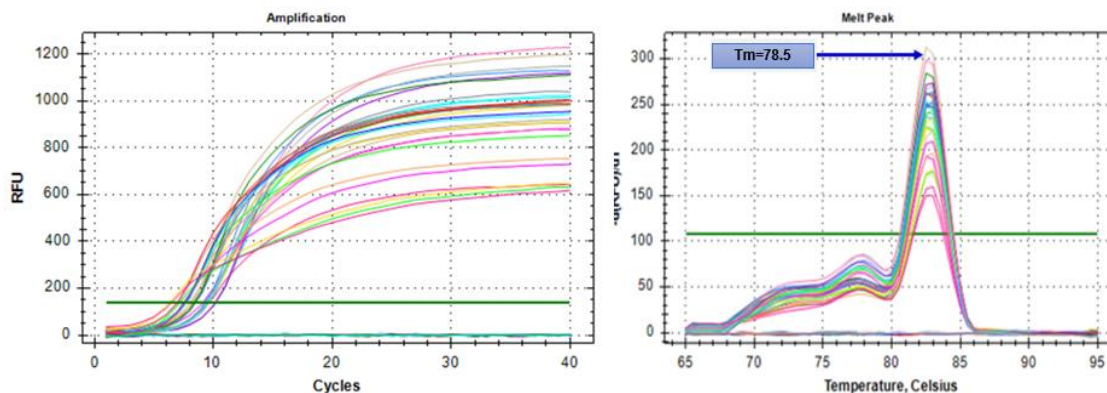


Figura 5. Curva de amplificación de los controles de NS5 y Curva de disociación (T_m) de los controles positivos.

Resultados de la curva estándar del gen NS5

A partir del ADN control para NS5 se construyó una curva estándar para la RT-PCR cuantitativa empleando diluciones seriadas 10x a partir de una muestra de ADN estandarizada desde 10×10^7 hasta $10 \times 10^{0.1}$ obtenidas para la curva de calibración de la prueba. Todas las diluciones seriadas fueron probadas en series de 8 repeticiones por dilución en la plataforma RT-PCR y el ciclo de umbral trazado en un gráfico que muestra el factor de dilución y ajuste los datos aplicando una ecuación de regresión lineal (Figura 6).

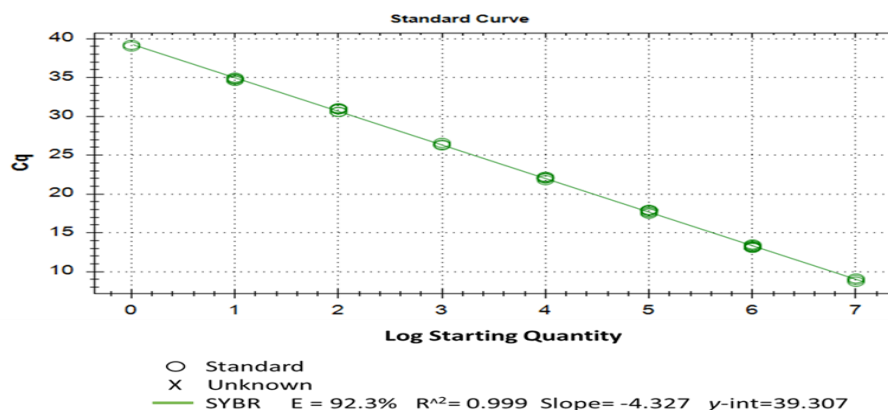


Figura 6. Curva estándar para el gen NS5 polimerasa del virus del dengue.

Resultados de RT-PCR para la detección del dengue

Un total de 44 hembras de *Aedes aegypti* agrupadas en 11 grupos de 4 hembras cada uno, fueron probadas por RT-PCR en tiempo real. Un total de 6 (54%) grupos resultaron positivos al virus del dengue, durante los meses de septiembre y octubre. De los grupos analizados en el noroeste el 50% (2/4) resultaron positivos, el 100% de los grupos del noreste y el 66.6% de los grupos del sureste fueron positivos, mientras que los grupos analizados del suroeste fueron negativos.

DISCUSIÓN

El mosquito *Aedes aegypti*, tiene gran impacto en la salud pública ya que es el vector principal de los virus causantes de diferentes enfermedades como: dengue, zika, chikungunya y fiebre amarilla (Kraemer et al., 2017). El dengue es una de las enfermedades de mayor impacto en el mundo, se estima que hay más de 400 millones de casos reportados por año y esto debido principalmente a la gran capacidad de adaptación a nuevos nichos ecológicos de su vector principal *Aedes aegypti* (Brady y Hay; 2020).

En el presente estudio se colectaron 545 mosquitos del género *Aedes aegypti*, el 97.8% se colectaron durante los meses de septiembre y octubre, 11 grupos de 4 mosquitos hembras fueron probadas bajo la plataforma desarrollada de RT-PCR que amplifica un fragmento de la NS5 polimerasa homólogo entre los 4 genotipos del dengue, que permitió obtener un diagnóstico de Pan-Dengue. El 54.6% (6/11) de los grupos de *A. aegypti* evaluados mediante RT-PCR resultaron positivos al virus Dengue. La situación del dengue en el norte del país no ha sido foco de atención en los últimos años, debido a que no se han presentado número elevado de casos, sin embargo, en 2022, Sonora fue el estado donde se reportó la mayor cantidad de casos de dengue en el país con un total de 2,257 casos. La Secretaría de Salud ha reportado 86 casos de dengue en Baja California entre 2020 y 2023, reportando mayor frecuencia en 2022 con 60 casos, de los cuales 56 se presentaron en el municipio de Ensenada y solo 2 casos fueron registrados en Mexicali, todos los casos reportados fueron tipificados como dengue genotipo

2. Mientras que, en el año 2023, hasta el momento se han registrado 29 casos, y encontramos en circulación los genotipos 1, 2 y 3.

La situación del dengue en el sur de México es grave, estados como Veracruz, Tabasco, Quintana Roo, Yucatán, Tamaulipas, Michoacán, Guerrero, Oaxaca y San Luis Potosí, han encabezado la lista de casos reportados al Panorama epidemiológico de dengue en los últimos años, lo cual podría atribuirse a que son regiones que cuentan con las condiciones climáticas y ambientales favorables para la presencia del vector y la transmisión del virus del dengue (Sánchez de la Cruz et al., 2020). Hasta la semana 46 de 2023, el panorama epidemiológico del dengue ha reportado que los estados que presentan la mayor cantidad de casos son Yucatán y Quintana Roo con más de 9 mil casos reportados y en ambos estados se reportan circulando los 4 genotipos del dengue (Secretaría de salud, 2023).

Se presentó una mayor frecuencia de *A. aegypti* durante los meses de septiembre y octubre, cuando las condiciones climáticas en Mexicali se consideran favorables para la presencia del mosquito ya que las temperaturas oscilan entre 20°C y 35°C, temperaturas que son similares a las de ciudades que colindan con Mexicali, donde anteriormente se realizaron estudios donde se estableció la presencia y distribución del mosquito *Aedes aegypti*. Metzger et al. (2017) reportaron la presencia del vector en el Valle Imperial en California desde el 2014, destacando mayor actividad del vector durante los meses de septiembre y octubre. De igual manera, Ernst et al., (2017) colectaron un total de 371 mosquitos en Nogales y 455 mosquitos en Hermosillo, durante los meses de julio

a septiembre, observando una diferencia significativa mayor para Hermosillo en el mes de septiembre, en el que se reportan temperaturas de entre 37-25°C. De la Mora-Covarrubias et al. (2010) realizaron un estudio similar en Chihuahua, para conocer la distribución y detección del virus del dengue por medio de la técnica RT-PCR en mosquitos *Aedes aegypti*, durante los meses de julio y agosto de 2005, estudiando 42 muestras y obteniendo como resultados un total de 57% de las muestras positivas al virus del dengue, cabe destacar que reportaron una baja densidad debido a que el estudio se realizó fuera de la temporada de lluvias con temperaturas que alcanzaban los 40°C.

En este estudio no se encontraron mosquitos de *Aedes albopictus*, sin embargo, Mexicali, colinda con California, USA donde se ha encontrado en la ciudad de Los Ángeles ubicada a una distancia de 360 km de Mexicali (Porse et al., 2015). En México, los estados más cercanos al sitio de estudio donde se ha encontrado *A. albopictus* son Nuevo León, Coahuila, Tamaulipas y Sinaloa, esto es debido a que esta especie requiere condiciones ambientales favorables para su establecimiento, tales como clima húmedo tropical-subtropical, abundante vegetación en selvas perennes y lluvias constantes derivadas de tormentas tropicales (Ortega-Morales et al., 2022), condiciones climáticas que no presenta Mexicali, Baja California.

CONCLUSIÓN

Este es el primer estudio en Mexicali, Baja California donde se identifica *Aedes aegypti*, la plataforma realizada permitió identificar el virus Dengue, encontrándose en todo el norte y el sureste de la ciudad. En este estudio no hubo presencia de *Aedes albopictus*, principalmente porque las condiciones climáticas no le favorecen para prevalecer en esta área. Se recomienda la vigilancia epidemiológica de todos los virus en los que puede participar como vector el mosquito *A. aegypti*.

REFERENCIAS

- Alm E., G. Lindegren, K. I. Falk, and N. Lagerqvist. 2015. One-step real-time RT-PCR assays for serotyping dengue virus in clinical samples. *BMC infectious diseases*.15:1-7.
- Anderson N. W., D. J. Jespersen, L. Rollins, B. Seaton, B., H. E. Prince and E. S. Theel. 2014. Detection of the dengue virus NS1 antigen using an enzyme immunoassay. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 79:194–197.
- Andries A. C., V. Duong, S. Ly, J. Cappelle, K. S. Kim, P. Lorn Try, S. Ros, S. Ong, R. Huy, P. Horwood, M. Flamand, A. Sakuntabhai, A. Tarantola and P. Buchy. 2015. Value of Routine Dengue Diagnostic Tests in Urine and Saliva Specimens. *PLoS neglected tropical diseases*. 9(9):1-30.
- Angel B., and V. Joshi. 2008. Distribution and seasonality of vertically transmitted dengue viruses in *Aedes* mosquitoes in arid and semi-arid areas of Rajasthan, India. *Journal of vector borne diseases*. 45(1): 56–59.
- Armas Y., M. M. Rodríguez y J. A. Bisset. 2005. Modificación de un método de extracción de ADN genómico de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Revista Colombiana de Entomología*. 31(2): 203.206
- Arredondo-García J. L, E. C. G. Aguilar-López, J. J. Aguilar Lugo-Gerez, N. Osnaya-Romero, G. Perez-Guille y H. Medina-Cortina. 2020. Panorama epidemiológico de dengue en México 2000-2019. *Rev Latin Infect Pediatr*. 33(2):78-83.

- Artika I. M., A. Wiyatno and C. N. Ma'roef. 2020. Pathogenic viruses: Molecular detection and characterization. *Infection, Genetics and Evolution*. 81:1-14.
- Beltramello M., K. L. Williams, C. P. Simmons, A. Macagno, L. Simonelli, N. T. Quyen, S. Sukupolvi-Petty, E. Navarro-Sanchez, P. R. Young, A. M. de Silva, F. A. Rey, L. Varani, S. S. Whitehead, M. S. Diamond, E. Harris, A. Lanzavecchia and F. Sallusto. 2010. The human immune response to Dengue virus is dominated by highly cross-reactive antibodies endowed with neutralizing and enhancing activity. *Cell host & microbe*. 8(3):271–283.
- Blacksell S. D., R. G. Jarman, R. V. Gibbons, A. Tanganuchitcharnchai, M. P. JR. Mammen, A. Nisalak, S. Kalayanarooj, M. S. Bailey, R. Premaratna, H. J. de Silva, N. P. Day, N. P. and D. G. Lalloo. 2012. Comparison of seven commercial antigen and antibody enzyme-linked immunosorbent assays for detection of acute dengue infection. *Clinical and Vaccine Immunology*. 19(5):804–810.
- Blacksell S. D. 2012. Commercial dengue rapid diagnostic tests for point-of-care application: Recent evaluations and future needs? *J Biomed. Biotechnol*. 2012:1-12.
- Brady O. J. and S. I. Hay. 2020. The Global Expansion of Dengue: How *Aedes aegypti* Mosquitoes Enabled the First Pandemic Arbovirus. *Annu Rev Entomol*. 65:191-208.
- Bollati M, K. Alvarez, R. Assenberg, C. Baronti, B. Canard, S. Cook, B. Coutard, E. Decroly, X. de Lamballerie, E. A. Gould, G. Grard, J. M. Grimes, R. Hilgenfeld, A. M. Jansson, H. Malet, E. J. Mancini, E. Mastrangelo, A.

- Mattevi, M. Milani, G. Moureau, J. Neyts, R. J. Owens, J. Ren, B. Selisko, S. Speroni, H. Steuber, D. I. Stuart, T. Unge and M. Bolognesi. 2010. Structure and functionality in flavivirus NS-proteins: perspectives for drug design. *Antiviral Res.* 87(2):125-48.
- Bhatt P., S. P. Sabeena, M. Varma and G. Arunkumar. 2021. Current Understanding of the Pathogenesis of Dengue Virus Infection. *Current microbiology.* 78(1):17–32.
- Calvert A., E. K. L. Boroughs, J. Laven, J. L. Stovall, B. E. Luy, O. I. Kosoy and C. Y. Huang. 2018. Incorporation of IgG Depletion in a Neutralization Assay Facilitates Differential Diagnosis of Zika and Dengue in Secondary Flavivirus Infection Cases. *J Clin Microbiol.* 56(6):1-13.
- Ciota A. T., and A. C. Keyel. 2019. The Role of Temperature in Transmission of Zoonotic Arboviruses. *Viruses.* 11(11):1-27.
- Colombo T. E, A. F. Versiani, K. R. Dutra, J. G. D. Rubiato, T. M. Galvão, A. F. Negri Reis and M. L. Nogueira. 2019. Performance of CDC Trioplex qPCR during a dengue outbreak in Brazil. *J Clin Virol.* 121:1-4.
- Chanama S., S. Anantapreecha, A. A-nuegoonpipat, A. Sa-gnasang, I. Kurane and P. Sawanpanyalert. 2004. Analysis of specific IgM responses in secondary dengue virus infections: levels and positive rates in comparison with primary infections. *Journal of clinical virology: the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology.* 31(3):185–189.
- Chan H. B. Y., C. H. How and C. W. M. Ng. 2017. Definitive tests for dengue fever: When and which should I use? *Singapore Med. J.* 58(11):632–635.

- Chen R. and N. Vasilakis. 2011. Dengue--quo tu et quo vadis?. *Viruses*. 3(9): 1562–1608.
- Chen L. H. and M. E. Wilson. 2016. Update on non-vector transmission of dengue: relevant studies with Zika and other flaviviruses. *Tropical diseases, travel medicine and vaccines*. 2:1-6.
- Cucunawangsih and N. Lugito. 2017. Trends of Dengue Disease Epidemiology. *Virology: research and treatment*. 8:1-6.
- Cleton N. B., G. J. Godeke, J. Reimerink, M. F. Beersma, H. R. Doorn, L. Franco, M. Goeijenbier, M. A. Jimenez-Clavero, B. W. Johnson, M. Niedrig, A. Papa, V. Sambri, A. Tami, Z. I. Velasco-Salas, M. P. Koopmans and C. B. Reusken. 2015. Spot the difference-development of a syndrome based protein microarray for specific serological detection of multiple flavivirus infections in travelers. *PLoS Negl Trop Dis*. 9(3):1-17.
- CDC. 2021. Centro para el control y la prevención de enfermedades. Síntomas y tratamientos. Disponible en línea: <https://www.cdc.gov/dengue/symptoms/index.html> acceso 14 septiembre 2021.
- Da Silva Voorham J. M., I. A. Rodenhuis-Zybert, N. V. Ayala Nuñez, T. M. Colpitts, H. van der Ende-Metselaar, E. Fikrig, M. S. Diamond, J. Wilschut and J. M. Smit. 2012. Antibodies against the envelope glycoprotein promote infectivity of immature dengue virus serotype 2. *PloS one*. 7(3):1-10.
- Dejnirattisai W., A. Jumnainsong, N. Onsirisakul, P. Fitton, S. Vasanawathana, W. Limpitikul C. Puttikhunt, C. Edwards, T. Duangchinda, S. Supasa, K.

- Chawansuntati, P. Malasit, J. Mongkolsapaya and G. Screaton. 2010. Cross-reacting antibodies enhance dengue virus infection in humans. *Science (New York, N.Y.)*. 328(5979):745–748.
- De la Mora-Covarrubias A., F. Jiménez-Vega y S. M. Treviño-Aguilar. 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.
- Diallo M., Y. Ba, A. A. Sall, O. M. Diop, J. A. Ndione, M. Mondo, L. Girault and C. Mathiot. 2003. Amplification of the sylvatic cycle of dengue virus type 2, Senegal, 1999–2000: Entomologic findings and epidemiologic considerations. *Emerg. Infect. Dis.* 9:362–367.
- Duangchinda T., W. Dejnirattisai, S. Vasanawathana, W. Limpitikul, N. Tangthawornchaikul, P. Malasit, J. Mongkolsapaya and G. Screaton. 2010. Immunodominant T-cell responses to dengue virus NS3 are associated with DHF. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(39):16922–16927.
- Dussart P., L. Baril, L. Petit, L. Beniguel, L. C. Quang, S. Ly, R.doS. Azevedo, J. B. Meynard, S. Vong, L. Chartier, A. Diop, O. Sivuth, V. Duong, C. M. Thang, M. Jacobs, A. Sakuntabhai, M. R. Nunes, V. T. Huong, P. Buchy and P. F. Vasconcelos. 2012. Clinical and virological study of dengue cases and the members of their households: the multinational DENFRAME Project. *PLoS neglected tropical diseases*. 6(1):1-13.

- Dwivedi V., I. Tripathi, R. Tripathi, S. Bharadwaj and S. Mishra. 2017. Genomics, proteomics and evolution of dengue virus. *Brief. Funct. Genomics*. 16:217–227.
- Eisen L., J. E. Garcia-Rejon, S. Gomez-Carro, M. del R. Nájera, T. J. Keefe, B. J. Beaty and M. A. Loroño- Piño. 2014. Temporal correlations between mosquito-based Dengue virus surveillance measures or indoor mosquito abundance and dengue case numbers in Mérida city, México. *Journal of Medical Entomology*. 51(4):885-890.
- Ernst K. C., K. R. Walker, P. Reyes-Castro, T. K. Joy, A. L. Castro-Luque, R. E. Diaz-Caravantes, M. Gameros, S. Haenchen, M. H. Hayden, A. Monaghan, E. Jeffrey-Gutierrez, Y. Carrière and M. R. Riehle. 2017. *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) Longevity and Differential Emergence of Dengue Fever in Two Cities in Sonora, Mexico. *J Med Entomol.*;54(1):204-211.
- Endy T. P., A. Nisalak, S. Chunsuttitwat, D. W. Vaughn, S. Green, F. A. Ennis, A. L. Rothman and D. H. Libraty. 2004. Relationship of preexisting dengue virus (DV) neutralizing antibody levels to viremia and severity of disease in a prospective cohort study of DV infection in Thailand. *The Journal of infectious diseases*. 189(6):990–1000.
- Ferede G., M. Tiruneh, E. Abate, Y. Wondimeneh, D. Dامتie, E. Gadisa, R. Howe, A. Aseffa, and B. Tessema. 2018. A serologic study of dengue in northwest Ethiopia: Suggesting preventive and control measures. *PLoS Negl Trop Dis*. 12(5):1-17.

- Gaikwad S., S. S. Sawant and J. S. Shastri. 2017. Comparison of nonstructural protein-1 antigen detection by rapid and enzyme-linked immunosorbent assay test and its correlation with polymerase chain reaction for early diagnosis of dengue. *Journal of laboratory physicians*. 9(3):177–181.
- García-Campos J. A., F. J. Guzmán-de la Garza, V. M. Alejandro-Quiroga, M. del C. González-Ruiz, H. Moreno-Sánchez y C. R. Cámara-Lemarroy. 2010. Dengue hemorrágico en un lactante después de primoinfección. *Boletín médico del Hospital Infantil de México*. 67(4): 359-363.
- Gwee S., A. L. St John, G. C. Gray and J. Pang. 2021. Animals as potential reservoirs for dengue transmission: A systematic review. *One health (Amsterdam, Netherlands)*. 12(100216):1-17.
- Gubler D. J. 2002. The global emergence/resurgence of arboviral diseases as public health problems. *Archives of medical research*. 33(4):330–342.
- Gubler D. J. in *Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever* 2nd edn (eds Gubler, D. J., Ooi, E. E., Vasudevan, S. & Farrar, J.) 1–29 (CAB International, 2014).
- Gulati S. and A. Maheshwari. 2012. Dengue fever-like illnesses: How different are they from each other?. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*. 44(7): 522-530.
- Guzman M. G., S. B. Halstead, H. Artsob, P. Buchy, J. Farrar, D. J. Gubler, E. Hunsperger, A. Kroeger, H. S. Margolis, E. Martínez, M.B. Nathan, J. L. Pelegrino, C. Simmons, S. Yoksan, and R. W. Peeling. 2010. Dengue: a continuing global threat. *Nature reviews. Microbiology*. 8(12 Suppl):7 – 16.
- Guzman M. G., M. Alvarez and S. 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*.158(7):1445–1459.
- Halstead S.B. 2002. Dengue hemorrhagic fever: Two infections and antibody dependent enhancement, a brief history and personal memoir. *Rev. Cubana Med. Trop.* 54(3): 171–179.
- Halstead S. B. 2007. Dengue. *Lancet (London, England)*. 370(9599):1644–1652.
- Halstead S. 2019. Recent advances in understanding dengue. *F1000Research*. 8(F1000 Faculty Rev): 1279:1-12.
- Hayden M. H., C. K. Uejio, K. Walker, F. Ramberg, R. Moreno, C. Rosales, M. Gameros, L. O . Mearns, E. Zielinski- Gutierrez and C. R. Janes. 2010. Microclimate and Human Factors in the Divergent Ecology of *Aedes aegypti* along the Arizona, U.S./Sonora, MX Border. *EcoHealth*. 7:64–77.
- Herrera Bornes M. F. 2021. Eficacia y seguridad de la vacuna contra el dengue. *Evidencia, Actualización En La práctica Ambulatoria*. 24(1):1-4.
- Hilgenboecker K., P. Hammerstein, P, Schlattmann, A. Telschow and J. H. Werren. 2008. How many species are infected with *Wolbachia*? A statistical analysis of current data. *FEMS Microbiol. Lett.* 281:215–220.
- Huang Q., A. S. Chen, Q. Li and C. Kang. 2011. Expression, purification, and initial structural characterization of nonstructural protein 2B, an integral membrane protein of Dengue-2 virus, in detergent micelles. *Protein expression and purification*. 80(2):169–175.
- Hunsperger E. A., S. Yoksan, P. Buchy, V. C. Nguyen, S. D. Sekaran, D. A. Enria, J. L. Pelegrino, S. Vázquez, H. Artsob, M. Drebot, D. J. Gubler, S. B. Halstead, M. G. Guzmán, H. S. Margolis, C. M. Nathanson, N. R. Rizzo

Lic, K. E. Bessoff, S. Kliksand R. W. Peeling. 2009. Evaluation of commercially available anti-dengue virus immunoglobulin M tests. *Emerging infectious diseases*. 15(3): 436–440.

Hunsperger E. A., J. Muñoz-Jordán, M. Beltran, C. Colón, J. Carrión, J. Vazquez, L. N. Acosta, J. F. Medina-Izquierdo, K. Horiuchi, B. J. Biggerstaff and H. S. Margolis. 2016. Performance of Dengue Diagnostic Tests in a Single-Specimen Diagnostic Algorithm. *The Journal of infectious diseases*. 214(6): 836–844.

INDRE. Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicas. 2009. Guía de colecta entomológica. Disponible en línea: http://www.cenaprece.salud.gob.mx/programas/interior/vectores/descargas/pdf/guia_colecta_entomologica_InDRE.pdf. (acceso 24 de marzo de 2022).

Jacobs M. G., P. J. Robinson, C. Bletchly, J. M. Mackenzie, P. R. Young. 2000. Dengue virus nonstructural protein 1 is expressed in a glycosyl-phosphatidylinositol-linked form that is capable of signal transduction. *FASEB J*. 14: 1603–1610.

Jones J. M., B. Lopez, L. Adams, F. J. Gálvez, A. S. Núñez, N. A. Santillán, L. Plante, R. R. Hemme, M. Casal, E. A. Hunsperger, J. Muñoz-Jordan, V. Acevedo, K. Ernst, M. Hayden, S. Waterman, D. Gomez, T. M. Sharp, K. Komatsu; Dengue Investigative Team; Arizona Department of Health Services; Yuma County Public Health Services District, Arizona; Division of Vector-Borne Diseases, National Center for Emerging and Zoonotic Infections Diseases, CDC, San Juan, Puerto Rico; University of Arizona;

Division of Global Migration and Quarantine, National Center for Emerging and Zoonotic Infectious Diseases, CDC; Epidemiology Elective Program, CDC. 2016. Binational Dengue Outbreak Along the United States-Mexico Border - Yuma County, Arizona, and Sonora, Mexico, 2014. MMWR Morb Mortal Wkly Rep. 65:(19):495-9.

Kabir M. A., H. Zilouchian, M. Sher and W. Asghar. 2020. Development of a flow-free automated colorimetric detection assay integrated with smartphone for Zika NS1. *Diagnostics*. 10(1):1-11.

Kabir M. A., H. Zilouchian, M. A. Younas and W. Asghar. 2021. Dengue Detection: Advances in Diagnostic Tools from Conventional Technology to Point of Care. *Biosensors (Basel)*. 11(7):1-28.

Kamal M, M. A. Kenawy, M. H. Rady, A. S. Khaled and A. M. Samy. 2018. Mapping the global potential distributions of two arboviral vectors *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus* under changing climate. *PLoS ONE*. 13(12): 1-21.

Kraemer M. U., M. E. Sinka, K. A. Duda, A. Q. Mylne, F. M. Shearer, C. M. Barker, C. G. Moore, R. G. Carvalho, G. E. Coelho, W. Van Bortel, G. Hendrickx, F. Schaffner, I. R. Elyazar, H. J. Teng, O. J. Brady, J. P. Messina, D. M. Pigott, T. W. Scott, D. L. Smith, G. R. Wint, N. Golding and S. I. Hay. 2015. The global distribution of the arbovirus vectors *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus*. *Elife*. 4:

Kroschewski H., S. P. Lim, R. E. Butcher, T. L. Yap, J. Lescar, P. J. Wright, S. G. Vasudevan and A. D. Davidson. 2008. Mutagenesis of the dengue virus

- type 2 NS5 methyltransferase domain. *The Journal of biological chemistry*. 283(28):19410–19421.
- Lanciotti R. S., C. H. Calisher, D. J. Gubler, G. J. Chang and A. V. Vorndam. 1992. Rapid detection and typing of dengue viruses from clinical samples by using reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* 30(3):545–555.
- Lee H., J. H. Ryu, H. S. Park, K.H. Park, H. Bae, S. Yun, A. R. Choi, S. Y. Cho, C. Park, D. G. Lee, D. J. Lim, J. Lee, S. Lee, S. Shin, H. Park and E. J. Oh. 2019. Comparison of Six Commercial Diagnostic Tests for the Detection of Dengue Virus Non-Structural-1 Antigen and IgM/IgG Antibodies. *Ann Lab Med.* 39(6):566–571.
- Li L., S. M. Lok, I. M. Yu, Y. Zhang, R. J. Kuhn, J. Chen and M. G. Rossmann. 2008. The Flavivirus Precursor Membrane-Envelope Protein Complex: Structure and Maturation. *Science*, 319(5871): 1830–1834.
- Lippi C. A., A. M. Stewart-Ibarra, M. Loor, J. Zambrano, N. Lopez, J. K. Blackburn and S. J. Ryan. 2019. Geographic shifts in *Aedes aegypti* habitat suitability in Ecuador using larval surveillance data and ecological niche modeling: Implications of climate change for public health vector control. *PLoS neglected tropical diseases*. 13(4):1-19.
- Liu L, A. Zhang and X. Wang. 2020. A Sensitive and Simple Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Using Polymer as Carrier. *Biol Pharm Bull.* 43(5):757-761.
- Mackay I. M., K. E. Arden and A. Nitsche. 2002. Real-time PCR in virology. *Nucleic acids research*. 30(6):1292–1305.

- Mathew A., and A. L. Rothman, A. L. 2008. Understanding the contribution of cellular immunity to dengue disease pathogenesis. *Immunological Reviews*. 225(1):300–313.
- Martina B. E, P. Koraka and A. D. Osterhaus. 2009. Dengue virus pathogenesis: an integrated view. *Clin Microbiol Rev*. 22(4):564-81.
- Metzger M. E., M. Hardstone Yoshimizu ,K. A. Padgett, R. Hu, V. L. Kramer. 2017. Detection and Establishment of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) Mosquitoes in California, 2011-2015. *J Med Entomol*. 54(3):533-543.
- Miller S., S. Kastner, J. Krijnse-Locker, S. Bühler and R. Bartenschlager. 2007. The non-structural protein 4A of dengue virus is an integral membrane protein inducing membrane alterations in a 2K-regulated manner. *The Journal of biological chemistry*. 282(12): 8873–8882.
- Mongkolsapaya J., W. Dejnirattisai, X. N. Xu, S. Vasanawathana, N. Tangthawornchaikul A. Chairunsri, S. Sawasdivorn, T. Duangchinda, T. Dong, S. Rowland-Jones, P. T. Yenichsomanus, A. McMichael, P. Malasit and G. Screaton. 2003. Original antigenic sin and apoptosis in the pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. *Nature medicine*. 9(7):921–927.
- Morin C. W., A. C. Comrie, K. Ernst. 2013. Climate and dengue transmission: Evidence and implications. *Environ Health Perspect*. 121: 1264–1272.
- Muller D. A., and P.R. Young. 2013. The flavivirus NS1 protein: molecular and structural biology, immunology, role in pathogenesis and application as a diagnostic biomarker. *Antiviral research*. 98 (2):192–208.

- Muller D. A., A. C. Depelseñaire and P. R. Young. 2017. Clinical and Laboratory Diagnosis of Dengue Virus Infection. *The Journal of infectious diseases*. 215(suppl_2):89–95.
- Murugesan A., and M. Manoharan. 2020. Dengue Virus. In: *Emerging and Reemerging Viral Pathogens, volumen 1: Fundamental and Basic Virology Aspects of Human, Animal and Plant Pathogens*. M.M. Ennaji, ed. Academic Press. p. 282.
- Murray N., M. Quam, A. Wilder-Smith. 2013. Epidemiology of dengue: past, present and future prospects. *Clin Epidemiol*. 5: 299–309.
- OMS. Organización Mundial de la Salud. Dengue y dengue grave. 2022 disponible en línea: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/dengue-and-severe-dengue> (acceso 29 de marzo de 2022).
- OMS. Organización Mundial de la Salud. 2009. Dengue: guidelines for diagnosis, treatment, prevention, and control-New Edition.
- OPS. Organización Panamericana de la Salud. Los casos de dengue se quintuplicaron en diez años, según nuevos datos de la OPS/OMS. 2014. Disponible en línea: https://www3.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=9657:2014-los-casos-dengue-americas-quintuplicaron-diez-anos-segun-nuevos-datos-opsoms&Itemid=1926&lang=es (acceso 10 de enero de 2022).
- OPS. Organización Panamericana de la Salud. Actualización epidemiológica Dengue, Chikungunya y Zika en el contexto de COVID-19: 23 de diciembre 2021. 2021. Disponible en línea:

<https://www.paho.org/es/documentos/actualizacion-epidemiologica-dengue-chikungunya-zika-contexto-covid-19-23-diciembre-2021#:~:text=23%20diciembre%202021-.Actualizaci%C3%B3n%20Epidemiol%C3%B3gica%20Dengue%2C%20Chikungunya%20y%20Zika%20en%20el%20contexto,COVID%2D19%3A%2023%20diciembre%202021&text=En%20la%20Regi%C3%B3n%20de%20las,1.324.108%20casos1%20de%20arbovirosis>. (acceso 10 de enero de 2022).

Ortega-Morales A. I., C. Pérez-Rentería, J. Ordóñez-Álvarez, J. A. Salazar, F. Dzul-Manzanilla, F. Correa-Morales, and H. Huerta-Jiménez. 2022. Update on the dispersal of *Aedes albopictus* in Mexico: 1988–2021. *Frontiers in Tropical Diseases*.2(72):1-6.

Ramberg F. 2017. Identification guide to the common mosquito species in Arizona. Dept Entomology University of Arizona. 1: 1-33.

Rodríguez-Morales A. J., W. E. Villamil-Gómez and C. Franco-Paredes. 2016. The arboviral burden of disease caused by co-circulation and co-infection of dengue, chikungunya and Zika in the Americas. *Travel Med Infect Dis*. 14:177–179.

Rothman A. 2011. Immunity to dengue virus: a tale of original antigenic sin and tropical cytokine storms. *Nat Rev Immunol*. 11:532–543.

SS. secretaria de salud. Manual técnico de entomología para el programa del paludismo. 2020. Disponible en línea: [https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/615138/Manual Tecnico](https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/615138/Manual_Tecnico)

[de Entomología para el Programa Paludismo 2020.pdf](#) (acceso 20 mayo de 2022)

SS. Secretaría de Salud. Sistema de vigilancia epidemiológica. 2021. Disponible en línea: <https://www.gob.mx/salud/acciones-y-programas/historico-boletin-epidemiologico> (acceso 20 de noviembre de 2021).

SS. Secretaria de salud. Panorama epidemiológico del dengue. 2022. disponible en línea: [https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/789466/Pano dengue 5 2_2022.pdf](https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/789466/Pano_dengue_5_2_2022.pdf) (acceso 15 de noviembre de 2023).

SS. Secretaria de salud. Panorama epidemiológico del dengue. 2023. disponible en línea: [https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/872090/Pano dengue 4 6_2023.pdf](https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/872090/Pano_dengue_4_6_2023.pdf) (acceso 15 de noviembre de 2023).

Sánchez-de la Cruz J. P., C. A. Tovilla-Zárate, D. L. González-Morales, y T. B. González-Castro. 2020. Riesgo de sindemia de COVID-19 y fiebre del dengue en el sur de México. *Gaceta médica de México*.156(5): 469-473.

Sellahewa K. H. 2013. Pathogenesis of Dengue Haemorrhagic Fever and Its Impact in Case Management. *ISRN Infectious Disease*. 2013:1-6.

Simmons C. P., J.J. Farrar, Vv. Nguyen and B. Wills. 2012. Dengue. *The New England journal of medicine*. 366(15):423–1432.

Singh J., N. Birbian, S. Sinha and A. Goswami. 2014. A critical review on PCR, its types and applications. *Int. J. Adv. Res. Biol.Sci*. 1(7):65–80.

- Scott T. W., L. H. Lorenz, and S. C. Weaver. 1990. Susceptibility of *Aedes albopictus* to infection with eastern equine encephalomyelitis virus. *J. Am. Mosq. Control. Assoc.* 6, 274–278.
- Pal S., A. L. Dauner, I. Mitra, B. M. Forshey, P. Garcia, A. C. Morrison, E. S. Halsey, T. J. Kochel and S. J. L. Wu. 2014. Evaluation of dengue NS1 antigen rapid tests and ELISA kits using clinical samples. *PLoS One.* 9(11):1-8.
- Parkash O. and R. H. Shueb. 2015. Diagnosis of Dengue Infection Using Conventional and Biosensor Based Techniques. *Viruses.* 7(10): 5410–5427.
- Peeling R. W., H. Artsob, J. L. Pelegriño, P. Buchy, M. J. Cardoso, S. Devi, D. A. Enria, J. Farrar, D. J. Gubler, M. G. Guzman, S. B. Halstead, E. Hunsperger, S. Kliks, H. S. Margolis, C. M. Nathanson, V. C. Nguyen, N. Rizzo, S. Vázquez and S. Yoksan. 2010. Evaluation of diagnostic tests: dengue. *Nature reviews. Microbiology,* 8(12 Suppl):30–38.
- Powell J. R. and W.J. Tabachnick. 2013. History of domestication and spread of *Aedes aegypti*--a review. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz,* 108 Suppl 1(Suppl 1): 11–17.
- Porse C. C., V. Kramer, M. H. Yoshimizu, M. Metzger, R. Hu, K. Padgett, and D. J. Vugia. 2015. Public health response to *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus* mosquitoes invading California, USA. *Emerging infectious diseases.* 21(10):1827.

- Pless E., J. R. Powell, K. R. Seger, B. Ellis, A. Gloria-Soria. 2022. Evidence for serial founder events during the colonization of North America by the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. *Ecology and Evolution*. 12(5):14.
- Rafaat N., S. D. Blacksell and R. J. Maude. 2019. A review of dengue diagnostics and implications for surveillance and control. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 113(11):653–660.
- Rathakrishnan A. and S. D. Sekaran. 2013. New development in the diagnosis of dengue infections. *Expert Opin Med Diagn*. 7(1):99-112.
- Rey J. R. y P. Lounibos. 2015. Ecología de *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus* en América y transmisión de enfermedades. *Biomédica*. 35(2):177-85.
- Santiago G. A., E. Vergne, Y. Quiles, J. Cosme, J. Vazquez, J.F. Medina, F. Medina, C. Colón, H. Margolis and J.L. Muñoz-Jordán. 2013. Analytical and clinical performance of the CDC real time RT-PCR assay for detection and typing of dengue virus. *PLoS Negl Trop Dis*. 7(7):1-15.
- Santiago A., J. Vazquez, S. Courtney, K. Y. Matias, L. E. Andersen, C. Colon, A. E. Butler, R. Roulo, J. Bowzard, J. M. Villanueva and J. L. Muñoz-Jordan. 2018. Performance of the CDC real time RT.PCR assay for detection and typing of dengue virus. *PLoS Negl Trop Dis*. 7(7): 1-15.
- Suzuki K., E. E. Nakayama, A. Saito, A. Egawa, T. Sato, J. Phadungsombat, R. Rahim, A. Hasan, H. Iwamoto, M. Rahman and T. Shioda. 2017. Evaluation of novel rapid detection kits for dengue virus NS1 antigen in Dhaka, Bangladesh, in 2017. *Virol J*. 16(1):1-15.

- Trojanek M., J. Maixner, N. Sojkova, H. Rohacova and F. Stejskal. 2016. Evaluation of dengue NS1 antigen rapid diagnostic test. *Int. J. Infect. Dis.* 53(Suppl.161): 1.
- Tsang T. K., S. L. Ghebremariam, L. Gresh, A. Gordon, M. E. Halloran, L. C. Katzelnick, D. P. Roja, G. Kuan and A. Balmaseda. 2019. Effects of infection history on dengue virus infection and pathogenicity. *Nat. Commun.* 10: 1–9.
- Turell M. J., C. N. Mores, D. J. Dohm, N. Komilov, J. Paragas, J. S. Lee, D. Shermuhemedova, T. P. Endy, A. Kodirov and S. Khodjaev. 2006. Laboratory transmission of Japanese encephalitis and West Nile viruses by molestus form of *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) collected in Uzbekistan in 2004. *Journal of medical entomology.* 43(2):296–300.
- Udayanga L, N. Gunathilaka, M. C. M. Iqbal, M. M. Najim, K. Pahalagedara and W. Abeyewickreme. 2018. Empirical optimization of risk thresholds for dengue: an approach towards entomological management of *Aedes* mosquitoes based on larval indices in the Kandy District of Sri Lanka. *Parasites Vectors.*11:1-12.
- Valdés K., M. Alvarez, M. Pupo, S. Vázquez, R, Rodríguez, and M. G. Guzmán. 2000. Human Dengue antibodies against structural and nonstructural proteins. *Clinical and diagnostic laboratory immunology.* 7(5):856–857.
- VanGuilder H. D., K. E. Vrana, and W. M. Freeman. 2008. Twenty-five years of quantitative PCR for gene expression analysis. *BioTechniques.* 44(5):619–626.

- Velandia M. I. y J. E. Castellanos. Virus del dengue: estructura y ciclo viral. *Infect. [online]*. 15(1):33-43.
- Vezzani D., S. M. Velázquez and N. Schweigmann. 2004. Seasonal pattern of abundance of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) in Buenos Aires City, Argentina. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 99(4): 351–356.
- Waggoner J. J., L. Gresh, M. J. Vargas, G. Ballesteros, Y. Tellez, K. J. Soda, M. K. Sahoo, A. Nuñez, A. Balmaseda, E. Harris and B.A. Pinsky. 2016. Viremia and Clinical Presentation in Nicaraguan Patients Infected With Zika Virus, Chikungunya Virus, and Dengue Virus. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 63(12):1584–1590.
- Wang W. K. and D. J. Gubler. 2018. Potential Point-of-Care Testing for Dengue Virus in the Field. *Journal of clinical microbiology*. 56(5):1-4.
- Wilder-Smith, A., E.E Ooi, O. Horstick and B. Wills. 2019. Dengue. *Lancet* (London, England), 393(10169):350–363.
- Whitehorn J and C. P. Simmons. 2011. The pathogenesis of dengue. *Vaccine*. 29(42):7221-7228.
- Zhang Y., W. Zhang, S. Ogata, D. Clements, J.H. Strauss, T.S. Baker, R. J. Kuhn and M. G. Rossmann. 2004. Conformational changes of the flavivirus E glycoprotein. *Structure* (London, England: 1993), 12(9):1607–1618.