



ARTÍCULO DE INVESTIGACIÓN

DetECCIÓN molecular del virus Dengue en mosquitos *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) de la ciudad de Sincelejo, Colombia

Pedro Blanco-Tuirán, Erwin Camacho-Burgos, Homer Corrales-Aldana, Viviana Ruiz-Contreras

Grupo Investigaciones Biomédicas, Universidad de Sucre, Sincelejo, Colombia.

Correspondencia: Homer Corrales-Aldana, Centro de Diagnóstico Médico, Universidad de Sucre, Carrera 14 No. 16 B-32, Apartado Aéreo 406, Sincelejo, Colombia. Teléfono: (575) 2820830; fax: (575) 2818130. homerdejesuscorrales@gmail.com

Recibido: 4 de abril de 2014. Aceptado: 3 de diciembre de 2014. Publicado: 1 de Junio de 2015.

RESUMEN

Introducción. El Dengue es la arbovirosis más importante en términos de morbi-mortalidad e impacto económico en el mundo. En Colombia, esta patología es considerada un problema de salud pública.

Objetivo. Estimar el nivel de infestación de mosquitos de la especie *Aedes aegypti* y determinar los serotipos del virus dengue (DENV) en área urbana del municipio de Sincelejo, Sucre (Colombia).

Materiales y métodos. Se realizaron capturas semanales de mosquitos hembra de *Ae. aegypti*, con trampas MosquiTRAP en el peridomicilio de viviendas ubicadas en el área urbana del municipio de Sincelejo, durante los meses de mayo a julio de 2013. Los serotipos de DENV fueron determinados mediante la técnica RT-PCR.

Resultados. Durante el periodo estudiado se recolectaron 233 hembras de *Ae. aegypti*, con un Índice Promedio de Hembras de *Ae. aegypti* capturadas (IMFA) de 0,85 mosquitos por trampa. En las muestras analizadas se identificaron los cuatro serotipos de DENV, pero DENV-2 se detectó con mayor frecuencia (65,6%). La tasa mínima de infección (MIR) general fue de 14,6 hembras infectadas por cada 100 mosquitos. Se encontró correlación significativa entre las tasas de infección por DENV en mosquitos y los casos de Dengue presentados en la población humana durante el período estudiado.

Conclusiones. La circulación simultánea de diferentes serotipos del virus en *Ae. aegypti*, supone un alto riesgo en la comunidad de Sincelejo para que se presenten, con mayor frecuencia, brotes de Dengue y Dengue grave, por lo que monitorear los índices de infestación vectorial y las tasas de infección de los serotipos en los mosquitos puede servir como un sistema de alerta temprana en la toma de decisiones para la prevención y control de la enfermedad por las autoridades de salud.

Palabras clave: Dengue, *Aedes aegypti*, índices de infestación, infección natural, mosquiTRAP

ABSTRACT

Molecular detection of Dengue virus in *Aedes aegypti* mosquitoes from Sincelejo City, Colombia

Introduction. Dengue is the most important arthropod-borne viral disease in the world in terms of morbidity, mortality and economic impact. The disease is a public health problem in Colombia.

Objective. To determine the serotypes of Dengue virus in *Ae. aegypti* mosquitoes in urban areas from Sincelejo City, Sucre (Colombia).

Materials and methods. Adult female mosquitoes were captured with Mosquitrap® in Sincelejo, between May - July 2013. Inspections were performed weekly over an eight-week period. Serotypes of Dengue virus were detected by RT-PCR.

Results. 233 *Ae. aegypti* females were captured, the Mean Female *Ae. aegypti* Index (IMFA) was 0,85. All four DENV serotypes were detected, DENV2 was the most common serotype detected (65,6%). The average rate of Dengue virus infection was 17,2%. Significant correlation was found between the weekly rates of DENV infections and dengue cases that occurred during the surveillance period.

Conclusions. The simultaneous circulation of different DENV serotypes in *Ae. aegypti* increases the outbreaks of dengue fever and severe dengue in the population from Sincelejo. So, monitoring of vector infestation indexes may be useful as an early warning system in making decisions regarding the prevention and control of the disease by health authorities.

Keywords: Dengue, *Aedes aegypti*, infestation indexes, natural infection, mosquiTRAP

INTRODUCCIÓN

El dengue es la arbovirosis más importante en términos de morbilidad, mortalidad e impacto económico a nivel mundial (WHO 2011). Esta enfermedad es causada por el virus Dengue (DENV) que pertenece a la familia *Flaviviridae*, género *Flavivirus* y está constituido por cuatro serotipos (DENV 1 al 4) (Rico-Hesse 1990). La transmisión del patógeno a los humanos ocurre, principalmente, a través de la picadura de mosquitos hembra de las especies *Ae. aegypti* y *Ae. albopictus* (Guzmán & Istúriz 2010). Se estima que cerca de 50 a 100 millones de personas se infectan anualmente en regiones tropicales y subtropicales del planeta; aproximadamente 500.000 casos son severos y 20.000 son fatales (Gubler 2006). A pesar del impacto que produce esta infección en la salud y en la economía mundial, no existe una terapia específica para su tratamiento y una vacuna licenciada en la actualidad, de tal forma que el control de la enfermedad depende de la asistencia médica brindada al paciente y del control vectorial (Durbin & Whitehead 2010).

En Colombia, las tasas de incidencia de la enfermedad se han incrementado en los últimos años, de 178 por 100.000 habitantes en 1999 a 493 por 100.000 habitantes en 2010 (Romero 2012). Los costos anuales por atención médica durante las epidemias se han estimado en US\$25,9 millones por atención ambulatoria y US\$56,3 millones por hospitalización (Alvis 2008). Durante el año 2010, se presentó la mayor epidemia de Dengue en la historia de Colombia, con un total de 157.202 casos de la enfermedad, 221 muertes confirmadas y una letalidad de 2,26% (Ministerio de la Protección Social 2010). De estas cifras, el departamento de Sucre notificó 1.840 para Dengue y 37 para Dengue grave (Secretaría de Salud Departamental, datos no publicados). En este departamento, las investigaciones relacionadas con esta enfermedad han estado orientadas a la serotipificación (Buelvas & Escamilla 2005) y genotipificación (Camacho 2010) del patógeno en muestras clínicas. Sin embargo, no hay información referente a la infección, con los serotipos del patógeno, en los mosquitos. Hasta la fecha, el único conocimiento sobre el vector surge como producto de la vigilancia entomológica realizada por las autoridades de salud, a través de la cual *Ae. aegypti* es monitoreado mediante los índices aélicos.

El objetivo de esta investigación fue determinar los serotipos de DENV que circulan en las poblaciones de mosquitos de la especie *Ae. aegypti* en la ciudad de Sincelejo, Colombia, con el fin de aportar una información para el fortalecimiento de la

vigilancia epidemiológica de la enfermedad en Sucre.

MATERIALES Y MÉTODOS

Tipo y área de estudio

Se realizó un estudio descriptivo de tipo transversal. La investigación se realizó en el municipio de Sincelejo (9°17'58" LN, 75°23'45" LO), ubicado en el departamento de Sucre, región Caribe Colombiana. Esta ciudad presenta una temperatura media anual de 27°C, una altura de 213 metros sobre el nivel del mar y una población de 267.571 habitantes.

Muestreo y procesamiento de insectos

Las capturas de mosquitos de la especie *Ae. aegypti* se llevaron a cabo en cuatro comunas del área urbana del municipio de Sincelejo: la comuna 3 (barrios El Cortijo y Pioneros), la comuna 5 (barrio La Palma), la comuna 6 (barrio Ciudadela Universitaria) y la comuna 7 (barrio Puerta Roja). Las capturas se realizaron con 28 trampas MosquiTRAP versión 3.0 (M trap; Ecovec Ltd., Belo Horizonte, Brazil) de acuerdo a lo descrito por Fávoro et al. (2006). Cada trampa fue georeferenciada e instalada a nivel peridomiciliario. Los puntos de muestreo se inspeccionaron semanalmente entre mayo y julio del año 2013, para un total de 8 revisiones. Las tarjetas pegajosas de las trampas se cambiaron cada 30 días y el atrayente (AtrAedes) cada 45 días, mientras que el agua en las trampas se reemplazó semanalmente.

El material entomológico fue identificado preliminarmente en campo, almacenado en RNAlater® (Qiagen, Alemania), debidamente rotulado y transportado al Laboratorio de Investigaciones Biomédicas de la Universidad de Sucre. Posteriormente, se realizó la confirmación de la especie con las claves taxonómicas de Rueda (2004), mediante observación de las estructuras morfológicas en un estereoscopio. Luego de la identificación, cada individuo se clasificó teniendo en cuenta el sexo, la trampa y fecha de captura. Se conformaron grupos de 1 a 13 hembras en viales (García-Rejón et al. 2011) que fueron conservados a -70°C, para garantizar la estabilidad del material genético hasta su procesamiento.

Detección y tipificación de DENV en mosquitos

El ARN viral de cada grupo de mosquitos se extrajo por el método de Trizol, de acuerdo a las recomendaciones del fabricante (Gibco-BRL, Gaithersburg, MD). La síntesis de ADNc se realizó por transcripción reversa (RT) de 5 µL de ARN usando la enzima SuperScript™ III First-Strand Synthesis System (Invitrogen TM, Carlsbad, CA, USA), según indicaciones del fabricante, y el Oligonucleótido D2 como cebador antisentido. El perfil térmico consistió en 50 minutos de retrotranscripción a 50°C y 5 minutos de inactivación de la enzima a 85°C.

Una dilución 1:10 del ADNc se utilizó como plantilla para la primera ronda de PCR llevada a cabo mediante el sistema OneTaq® Quick-Load® 2X Master Mix – NEB, con los cebadores D1 y D2 previamente reportados (Lanciotti et al. 1992) y bajo las siguientes condiciones: 12,5 µL de OneTaq® Quick-Load® 2X Master Mix (New England Biolabs), 0,5 µL de cada cebador (D1 y D2) a 10 µM, 8,5 µL de agua ultra pura y 3 µL de ADNc, en un volumen final de 25 µL. La reacción se realizó en un termociclador Bio-Rad (C1000 Thermal Cycler) con una desnaturalización inicial a 94°C por 3 minutos, seguido de 35 ciclos de desnaturalización (94°C) por 30 segundos, alineamiento (55°C) por 45 segundos y extensión (68°C) por 1 minuto, y una fase posterior de extensión final a 68°C por 5 minutos.

Los productos amplificados se diluyeron 1:100 en agua ultra pura y se utilizaron 3 µL en la segunda ronda bajo condiciones descritas anteriormente, pero usando los cebadores específicos para cada uno de los cuatro serotipos: D1 y TS1 (DENV 1: 482 pb), D1 y TS2 (DENV 2: 119 pb), D1 y TS3 (DENV 3: 290pb) y D1 y DEN4 (DENV 4: 389 pb) (Harris et al. 1998; Lanciotti et al. 1992). Se utilizó el mismo perfil térmico de la primera ronda. Para validar los resultados de cada una de las reacciones de PCR, se usó como control positivo una mezcla de las cepas virales 16007, 16681, 16562 y 1036, que corresponden a cada uno de los cuatro serotipos del virus Dengue, y como controles negativos se empleó agua ultra pura y extractos de ARN de mosquitos machos de *Ae. aegypti*.

Electroforesis en gel de Agarosa

Los productos de la RT-PCR fueron separados por electroforesis en un gel de agarosa al 2% con tampón TBE 0.5X (Tris-Ácido Bórico, EDTA), durante 45 minutos a 80 voltios, previa tinción con SYBR Safe® y visualizados en un Fotodocumentador QUANTUM-ST4-3026/WL/LC/26MX X-Press®. En cada procedimiento se utilizó un marcador de peso molecular (100 bp DNA Ladder – Invitrogen) para confirmar el tamaño de la

banda.

Análisis de la información

Se estimó el Índice Promedio de hembras de *Ae. aegypti* capturadas por semana (IMFA) como el resultado de dividir el número de hembras de *Ae. aegypti* capturadas entre el número total de trampas inspeccionadas. Se consideraron las siguientes categorías de riesgo para el IMFA: menor a 0,15 se consideró satisfactorio, entre 0,15 y 0,3 moderado, entre 0,3 y 0,6 en alerta y mayor a 0,6 en estado crítico (ECOVEC 2013). Se determinó el Índice de Positividad de las MosquiTRAP (IPM), propuesto por Eiras & Resende (2009), que resulta de dividir el número de trampas positivas entre el número total de trampas inspeccionadas. Adicionalmente, se calculó la tasa mínima de infección (MIR) con DENV de los mosquitos por semana.

Se evaluó la asociación entre el nivel de infestación vectorial en la zona (IMFA) y la tasa promedio de infección por DENV en los mosquitos con el número de casos de dengue que se confirmaron en el período de estudio, mediante una regresión lineal simple con el coeficiente no paramétrico de Spearman. La asociación entre el grado de infestación de las zonas de estudio y las semanas de muestreo fue determinada mediante un análisis de varianza de Kruskal-Wallis con el software InfoStat.

RESULTADOS

Durante el período estudiado se recolectaron 233 hembras de la especie *Ae. aegypti*. El promedio de los índices IMFA e IPM durante las 8 semanas fue de 0,85 (IC 95% ±0,323) y 42,8% (IC 95% ±0,139) respectivamente. Al graficar el IMFA y el número de casos de dengue que se confirmaron durante este tiempo, se observó un comportamiento similar a partir de la semana 3, sin embargo, no se encontró correlación lineal positiva entre estas dos variables ($R^2 = 0,32$ $p = 0,1466$) (Fig. 1). Los mapas de infestación de acuerdo al número de mosquitos capturados por trampa en cada semana se muestran en la Fig. 2. No se encontró diferencia estadística en el grado de infestación entre las zonas de estudio ($p = 0,097$), pero sí entre las semanas de muestreo ($p = 0,023$).

La tasa promedio de infección con DENV en los mosquitos fue de 17,2% (IC 95% ±0,061), la cual presentó correlación significativa con el número de casos de dengue que se confirmaron en este período ($R^2 = 0,73$ $p = 0,0394$). Con el empleo de pruebas moleculares, se detectaron los cuatro serotipos de DENV (Fig. 3), pero el más frecuente fue DENV2 (65,6%), seguido de DENV3 (21,8%).

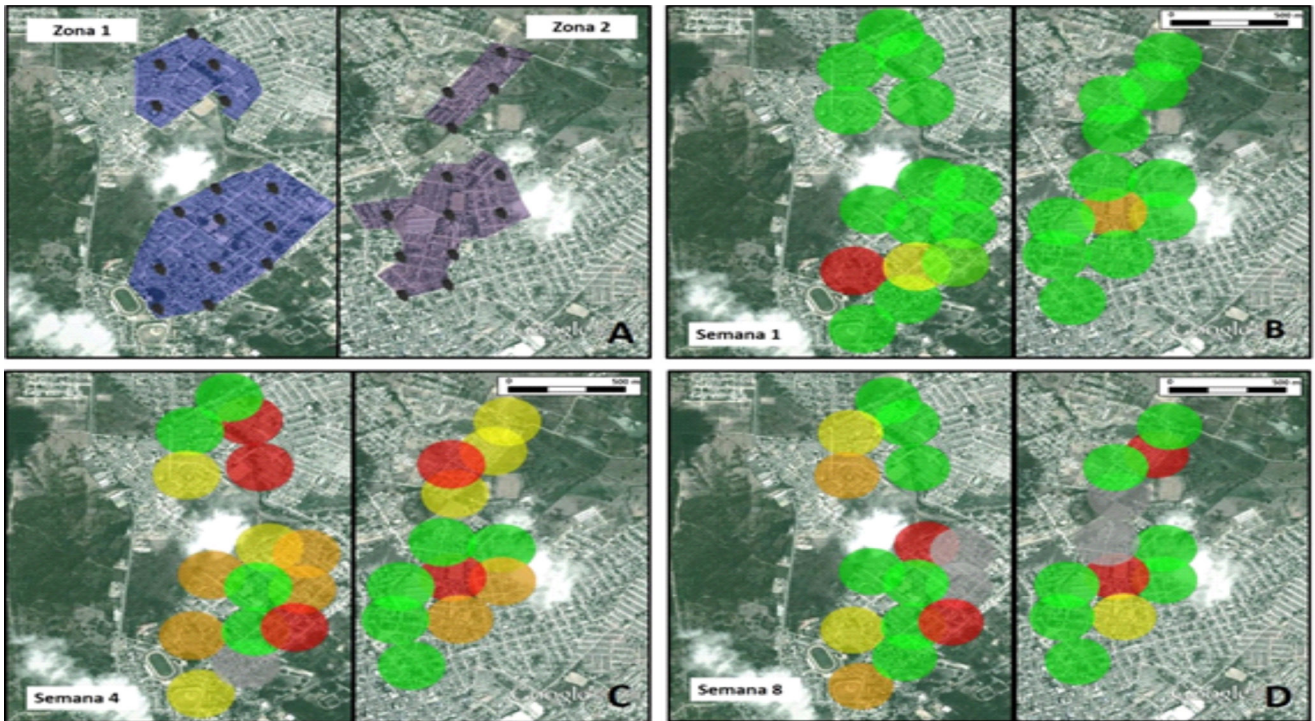


Figura 1. Zonas de Sincelejo donde se realizaron los muestreos. (A) Ubicación de las trampas en las dos zonas de muestreo; los polígonos de color muestran el límite de cada barrio. Captura de mosquitos con Mosquitrap durante las semanas 1 (B), 4 (C) y 8 (D). Se muestran polígonos de color de acuerdo a la captura de ninguno (verde), uno (amarillo), dos (naranja) y tres o más (rojo) mosquitos. Los polígonos en gris representan trampas no inspeccionadas.

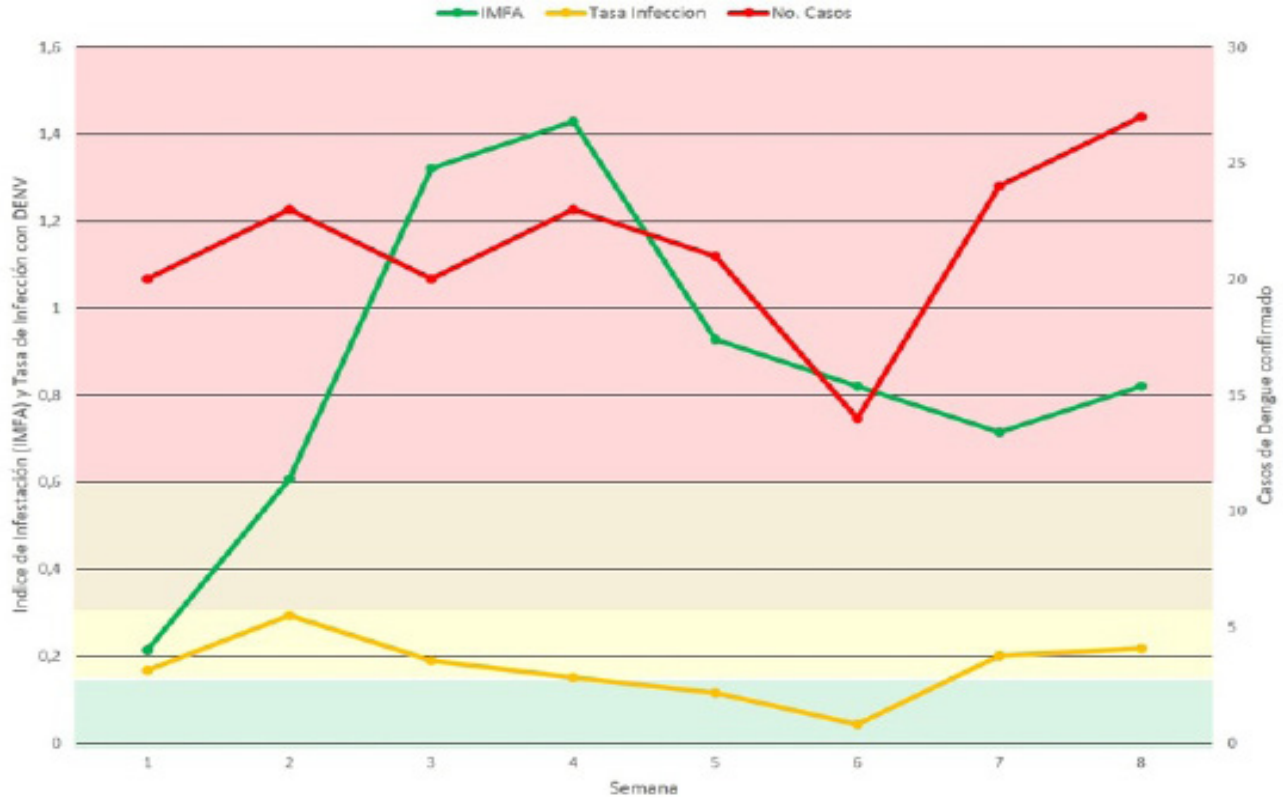


Figura 2. Representación semanal del Índice Promedio de Hembras de *Ae. aegypti* (IMFA), las tasas de infección por virus Dengue en los mosquitos y el número de casos confirmados de dengue durante el periodo de estudio (Datos Secretaría de Salud Departamental de Sucre). Los colores en el fondo representan el grado de infestación de acuerdo al IMFA: Rojo (Crítico), Naranja (Alerta), Amarillo (Moderado) y Verde (Satisfactorio).



Figura 3. Electroforesis en gel de agarosa de productos de RT-PCR semianidada (tinción con SYBR Safe). Línea 1: Marcador de peso molecular 100 pb Invitrogen; líneas 2 y 3: controles negativos; línea 4: control positivo para DENV 1 (482 pb), DENV 2 (119 pb), DENV 3 (290 PB) y DENV 4 (389 pb); líneas 5, 6, 7, 9 y 10: muestras de *Ae. aegypti* positivas para el virus Dengue; línea 8: muestra de *Ae. aegypti* negativa para el genoma viral.

DISCUSIÓN

Los resultados de esta investigación constituyen la primera evidencia molecular de circulación del virus Dengue en poblaciones de mosquitos *Ae. aegypti* en el departamento de Sucre, por lo tanto representan una herramienta valiosa para identificar los vectores de este agente infeccioso y el análisis eco-epidemiológico de la aparición de posibles brotes en el norte de Colombia.

La infección de mosquitos con los serotipos de DENV encontrados en este trabajo sugiere una dinámica poblacional activa que el virus utiliza para colonizar exitosamente grandes extensiones geográficas. Esta afirmación está sustentada en el hecho que hasta 2004 no había reporte de circulación de DENV1 en el departamento de Sucre, aunque nuestros hallazgos lo muestran como uno de los serotipos menos prevalentes durante el período de estudio. Por otra parte, se confirmó la presencia del serotipo DENV3 en esta región, el cual estuvo ausente en Colombia por lo menos tres décadas (Ocazonez et al. 2006). Este es el primer estudio que reporta su circulación endémica (mayo – julio 2013) en el departamento de Sucre, después de su re-emergencia en la región nororiente de este país en 2001. Con relación al serotipo DENV4, de acuerdo con los reportes del INS, no había sido reportado o re-introducido en Colombia hasta hace cuatro años y por lo tanto su re-introducción es considerada aún más reciente.

Se ha encontrado que el incremento en las tasas de infección de mosquitos por el virus está asociado con el incremento en las tasas de infección humana (Méndez et al. 2006). Por lo tanto, la correlación significativa entre la tasa promedio de infección con

DENV en los mosquitos y el número de casos de dengue que se confirmaron en el período de estudio, señalan la existencia de riesgos potenciales para las poblaciones humanas en el departamento de Sucre y requieren la intensificación de medidas de vigilancia epidemiológica y prevención. Nuestros resultados son consistentes con estudios previos que sugieren que la vigilancia virológica mediante RT-PCR para la detección de mosquitos *Aedes* infectados en campo puede servir como un sistema de alerta temprana para los brotes de dengue (Méndez et al. 2006; Urdaneta et al. 2005).

Estos resultados demuestran que el número de hembras de *Ae. aegypti* capturadas por MosquiTRAP proporcionó una buena correlación con la ocurrencia de dengue. Según Fávoro et al. (2008), la mejor precisión para capturar adultos que proporciona MosquiTRAP, permite una mejor estimación de la población adulta. Esto justifica el uso de la trampa en programas de control, ya que sus índices entomológicos permiten evaluar el riesgo y la evaluación de las medidas de control vectorial de forma más precisa, y permite la determinación segura de umbrales para la ocurrencia de la transmisión de Dengue en un área determinada (De Melo et al. 2012). Sin embargo, es importante considerar que la correlación entre la ocurrencia de los casos de fiebre de dengue y la detección del vector solo ocurre si las dinámicas entre el vector, el virus y los hospederos son favorables, lo cual depende de varios factores distintos de la densidad de población de *Ae. aegypti* (Eisen & Eisen 2008).

CONCLUSIONES

Los hallazgos ratifican la categorización del departamento de
Rev. Inv. Med. Trop. 2015; 1: 1-7

Sucre como una región hiperendémica, lo que implica para la población un alto riesgo de presentar episodios de dengue y, en casos más graves, dengue severo, lo cual representa un importante problema de salud pública. De esta forma, es evidente la necesidad de la vigilancia entomológica de un índice o una medida de la densidad de la población de *Ae. aegypti* que permita a los servicios de salud la prevención de la transmisión de dengue. Debido a que hoy en día la erradicación del vector no es factible, el objetivo de los programas nacionales de control debería focalizarse en las medidas preventivas, es decir, mantener el vector en una densidad poblacional por debajo del nivel que favorece la transmisión viral sostenida.

FINANCIACIÓN

Este trabajo fue desarrollado durante la beca pasantía Joven Investigador e Innovador Virginia Gutiérrez de Pineda, otorgada a Homer Corrales Aldana (Colciencias; convocatoria 525 de 2011). Agradecemos el apoyo financiero del proyecto “Sistema de vigilancia Ecoepidemiológico del virus Dengue en el departamento de Sucre”; Código: 112954531519 (Colciencias, convocatoria 545 de 2011).

CONFLICTO DE INTERÉS

Ninguno de los autores declara conflictos de interés para la publicación de este manuscrito.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Jorge Osorio de la Universidad de Wisconsin (UW) por la donación de las cepas virales.

REFERENCIAS

Alvis N. 2008. Impacto económico del dengue en Colombia. *Infectio*. 12(Supl.1):7-20.

Buelvas Y, Escamilla A. 2005. Determinación de los serotipos circulantes del virus Dengue en el municipio de Sincelejo utilizando RT-PCR. Trabajo de grado de Biología. Sincelejo: Universidad de Sucre.

Camacho E. 2010. Epidemiología molecular del virus dengue circulante en el departamento de Sucre. Trabajo de Grado de Biología. Sincelejo: Universidad de Sucre.

De Melo DPO, Scherrer LR, Eiras AE. 2012. Dengue fever occurrence and vector detection by larval survey, Ovitrap and MosquiTRAP: a space-time clusters analysis. *Plos one* 7(7): 1-14.

Durbin AP & Whitehead SS. 2010. Dengue vaccine candidates in development. *Curr Top Microbiol Immunol* 338: 129-143.

ECOVEC 2013. MI-Dengue: A novel tool for dengue vector monitoring in Brazil. Fecha de consulta: 4 de septiembre de 2013. Disponible en: http://www.ecovec.com/Artigos_Publicacoes/IPC_JulAug13_MI_Dengue.pdf

Eiras AE & Resende MC. 2009. Preliminary evaluation of the “Dengue-MI” technology for *Aedes aegypti* monitoring and

control. *Cad Saude Publica* 25(1): 45-58.

Eisen RJ & Eisen L. 2008. Spatial modeling of human risk of exposure to vector-borne pathogens based on epidemiological versus arthropod vector data. *J Med Entomol* 45(2): 181-192.

Fávoro EA, Dibo MR, Mondini A, Ferreira AC, Barbosa AA, Eiras AE, et al. 2006. Physiological state of *Aedes (Stegomyia) aegypti* mosquitoes captured with MosquiTRAPs in Mirassol, São Paulo, Brazil. *J Vector Ecol* 31(2): 285-291.

Fávoro EA, Mondini A, Dibo MR, Barbosa AA, Eiras AE, Chiaravalloti-Neto FC. 2008. Assessment of entomological indicators of *Aedes aegypti* (L.) from adult and egg collections in São Paulo, Brazil. *J Vector Ecol* 33(1): 8-16.

García-Rejón JE, Loroño-Pino MA, Farfán-Ale JA, Flores-Flores LF, López-Urbe MP, Najera-Vazquez MR, et al. 2011. Mosquito infestation and dengue virus infection in *Aedes aegypti* females in schools in Mérida, México. *Am J Trop Med Hyg* 84(3): 489-496.

Gubler DJ. 2006. Dengue/dengue haemorrhagic fever: history and current status. *Novartis Found Symp* 277: 3-16.

Guzmán A & Istúriz RE. 2010. Update on the global spread of dengue. *Int J Antimicrob Agents* 36(1): 40-42.

Harris E, Roberts TG, Smith L, Selle J, Kramer LD, Valle S, et al. 1998. Typing of dengue viruses in clinical specimens and mosquitoes by single tube multiplex reverse transcriptase PCR. *J Clin Microbiol* 36(9): 2634-2639.

Lanciotti RS, Calisher CH, Gubler DJ, Chang GJ, Vorndam AV. 1992. Rapid detection and typing of dengue viruses from clinical samples by using reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 30(3): 545-551.

Méndez F, Barreto M, Arias JF, Rengifo G, Muñoz J, Burbano ME, Parra B. 2006. Human and mosquito infections by dengue viruses during and after epidemics in a dengue-endemic region of Colombia. *Am J Trop Med Hyg* 74(4): 678-683.

Ministerio de la Protección Social. 2010. Informe epidemiológico alerta de dengue en Colombia – Sur América 2010. República de Colombia. Dirección General de Salud Pública. Fecha de consulta: 2 de septiembre de 2013. Disponible en: <http://www.minsalud.gov.co/Documentos%20y%20Publicaciones/Informe%20epidemiol%C3%B3gico%20%202010.pdf>

Ocazonez RE, Cortés FM, Villar LA, Gómez SY. 2006. Temporal distribution of dengue virus serotypes in Colombian endemic area and dengue incidence. Re-introduction of dengue-3 associated to mild febrile illness and primary infection. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 101(7): 725-731.

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

Romero L. 2012. Informe final del evento Dengue, año 2012. Instituto Nacional de Salud. Dirección de vigilancia y análisis de riesgo en salud pública. Bogotá; Pág. 1-19.

Rueda LM. 2004. Pictorial keys for the identification of mosquitoes (Diptera: Culicidae) associated with dengue virus transmission. *Zootaxa* 589: 1-60.

Urdaneta L, Herrera F, Pernalet M, Zoghbi N, Rubio-Palis

Y, Barrios R, et al. 2005. Detection of dengue viruses in field-caught *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) in Maracay, Aragua state, Venezuela by type-specific polymerase chain reaction. *Infect Genet Evol* 5(2): 177-184.

World Health Organization (WHO). 2011. Dengue/dengue haemorrhagic fever. 2011. Fecha de consulta: 4 de septiembre de 2013. Disponible en: <http://www.who.int/csr/disease/dengue/en/>