

Distribución geoespacial y detección del virus del dengue en mosquitos *Aedes (Stegomyia) aegypti* de Ciudad Juárez, Chihuahua, México

Antonio de la Mora-Covarrubias, PhD,⁽¹⁾ Florinda Jiménez-Vega, Dra en C,⁽²⁾
Sandra Maritza Treviño-Aguilar, Biol,⁽²⁾

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

De la Mora-Covarrubias A,
Jiménez-Vega F, Treviño-Aguilar SM.
Geospatial distribution and detection
of dengue virus in *Aedes (Stegomyia) aegypti* mosquitos
in Ciudad Juárez, Chihuahua, Mexico.
Salud Publica Mex 2010;52:127-133.

Resumen

Objetivo. Determinar la distribución de *Aedes aegypti* en Ciudad Juárez, México, y evaluarlo como portador del virus del dengue. **Material y métodos.** Se colectaron mosquitos empleando minitrampas CDC. Se aplicaron técnicas geoespaciales del vecino más próximo y función K. Para evaluar la asociación entre la presencia del vector y variables sociodemográficas se aplicó la prueba de χ^2 . Las pruebas de infección fueron mediante RT-PCR. **Resultados.** Se capturaron 122 mosquitos hembra. Se demostró la tendencia de distribución en conglomerado ($R = -1.2995$, $p = 0.05$) del mosquito a los 4000 m pero ninguna de las variables sociodemográficas mostró asociación significativa. Siete lotes evaluados fueron positivos para DEN-2, diez para DEN-3 y siete para ambos serotipos. **Conclusiones.** Es el primer reporte de la presencia de mosquitos *Aedes aegypti* infectados con dengue en la región, lo que permitirá promover su vigilancia con el fin de disminuir la probabilidad de ocurrencia de la enfermedad entre la población fronteriza.

Palabras clave: Aedes; mosquito; dengue; distribución espacial; México

Abstract

Objective. To determine the distribution of *Aedes aegypti* in Ciudad Juárez, Mexico and evaluate it as a carrier of the dengue virus. **Material and Methods.** Mosquitoes were collected using CDC minitraps. Nearest neighbor and K-function were used as geospatial tools. The chi-square test was utilized to evaluate the association between the presence of the vector and sociodemographic variables. Evidence of infection was detected by RT-PCR. **Results.** A total of 122 female mosquitoes were captured. A tendency in the cluster distribution ($R = -1.2995$, $p = 0.05$) of the mosquito was shown up to 4000 m but none of the sociodemographic variables showed significant associations. Seven of the pools tested were positive for DEN-2, ten were positive for DEN-3, and seven for both serotypes. **Conclusions.** This is the first report on the presence of *Aedes aegypti* mosquitoes infected with dengue in the region, which will enable the promotion of monitoring in order to reduce the probability of occurrence of the disease among the border population.

Key word: Aedes; mosquito; dengue; spatial distribution; Mexico

(1) Unidad de Cartografía Digital, Universidad Autónoma de Ciudad Juárez. Cd. Juárez, Chihuahua, México.

(2) Laboratorio de Biotecnología, Universidad Autónoma de Ciudad Juárez. Cd. Juárez, Chihuahua, México.

Fecha de recibido: 21 de abril de 2009 • **Fecha de aceptado:** 15 de diciembre de 2009
Solicitud de sobretiros: Dr. Antonio de la Mora Covarrubias. Universidad Autónoma de Ciudad Juárez.
Anillo Envolvente del Pronaf s/n. 32310 Cd. Juárez, Chihuahua, México.
Correo electrónico: adelamor@uacj.mx

El mosquito *Aedes aegypti* (diptera:culicidae), vector de los virus del dengue, fiebre amarilla y oeste del Nilo, entre otros,¹ tiene su origen en el cinturón tropical de África donde generalmente se encuentran las especies del subgénero *Stegomyia*.² Esta especie se caracteriza por su preferencia por climas cálidos (de 15 a 40 °C) y con niveles de precipitación pluvial moderados y altos, donde se generan condiciones ambientales favorables para su reproducción.³

El crecimiento poblacional, el movimiento migratorio en viajes internacionales, la urbanización descontrolada y la pobreza expresada en problemas de vivienda, educación, abasto de agua y recolección de desechos sólidos son algunos de los factores que han permitido la dispersión y establecimiento del vector.⁴ El mosquito está bien adaptado a ambientes domésticos y peridomésticos, debido principalmente al hábito hematofágico de las hembras.⁵

El dengue es una enfermedad viral infecciosa, reemergente, de carácter endémico-epidémico, que constituye hoy la arbovirosis más importante a nivel mundial en términos de morbilidad, mortalidad y afectación económica.⁶ Casi la mitad de la población mundial está en riesgo de sufrir esta infección por habitar en áreas tropicales y subtropicales, así como más de 400 millones de viajeros de Europa y Norteamérica que cada año cruzan las fronteras y regresan a sus países procedentes de Asia, África y América Latina.⁷

El virus del dengue presenta cuatro serotipos (DENV-1, DENV-2, DENV-3 y DENV-4), relacionados entre sí pero de antígenos diferenciados.⁸ Los cuatro producen, por lo general, una enfermedad febril autolimitada; sin embargo, tienen un espectro clínico muy amplio que va desde formas asintomáticas hasta su forma más grave, denominada dengue hemorrágico.⁹

Se calcula que existen entre 50 y 100 millones de casos anuales en más de 100 países. De esos casos, más de 500 000 son de dengue hemorrágico, variedad que además de requerir cuidados intensivos hospitalarios, causa alrededor de 24 000 defunciones.¹⁰ La tasa de ataque del dengue puede llegar a afectar hasta a 90% de las personas susceptibles, con un índice de letalidad de hasta 5 por ciento.¹¹ En 1999, la Organización Mundial de la Salud (OMS) incluyó al dengue como una enfermedad de máxima importancia para la investigación.¹²

El dengue y el mosquito vector son endémicos de África y Asia;¹³ sin embargo, en América se ha producido un incremento progresivo de casos durante las tres últimas décadas.¹⁴⁻¹⁶ En México, la primera epidemia de dengue hemorrágico ocurrió en 1995. A partir de entonces, el número de casos de dengue ha aumentado y la incidencia pasó de 5 220 casos en 2003 a 40 559 en 2007. Aunque en la actualidad en México circulan los

cuatro serotipos virales, el número de muertes por dengue se ha mantenido por debajo de 1% del total de casos de dengue hemorrágico. La OMS coloca a México como el país que ocupa el quinto lugar de incidencia en América Latina.¹⁷

Para disminuir el efecto negativo en la salud humana asociado a enfermedades arbovirales se debe implementar un sistema de vigilancia epidemiológica que incluya la detección temprana de circulación del virus y la distribución y fluctuación de la población vectorial.^{18,19} Para el diagnóstico temprano la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa de transcripción reversa (RT-PCR) ha demostrado ampliamente su eficiencia.²⁰

En la región binacional Paso del Norte, que incluye el municipio de Juárez, Chihuahua, en México y los condados de El Paso, Texas y Doña Ana, Nuevo México, en Estados Unidos, se están iniciando acciones encaminadas a determinar cuáles son los mosquitos transmisores de enfermedades que se encuentran en la región. La alta migración en esta zona geográfica, asociada con un constante intercambio de bienes provenientes de diversas partes del mundo, pone de manifiesto la importancia de realizar estudios encaminados a la detección temprana del vector del dengue. Particularmente este trabajo tiene como objetivo detectar la circulación de los serotipos del virus del dengue mediante la técnica de RT-PCR y estimar la distribución geoespacial de mosquitos adultos de *Aedes aegypti* en la comunidad de Ciudad Juárez, Chihuahua, declarada hasta el momento como libre de la enfermedad.

Material y métodos

Ciudad Juárez se encuentra ubicada al noroeste del municipio de Juárez, en el estado de Chihuahua, México. Se localiza a los 31° 44' 22" latitud norte y 106° 26' 29" longitud oeste, a una altura promedio de 1116 msnm. Cuenta con 1 313 338 habitantes distribuidos en un área total aproximada de 1 200 km².²¹

Para evaluar la distribución geoespacial del mosquito adulto de *Ae. aegypti* en la ciudad se utilizaron minitrampas CDC de luz (modelo 512) y CO₂ (hielo seco) como atrayente y fuente de energía a base de baterías 6V Li-Ne recargables. Se colocó una trampa en cada Área Geográfica Básica de Referencia (AGEB) de las cuales el Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI) reporta estadísticas de población y vivienda. Las trampas fueron colocadas en casas-habitación ubicadas lo más cercanas al centroide de cada una de las AGEB considerando aspectos como accesibilidad, anuencia de los moradores, seguridad y presencia de potenciales criaderos. Cada punto de colecta fue georreferenciado con un geoposicionador

satelital. Dado que el mosquito presenta un patrón de picadura bimodal matutino y vespertino, las trampas se dejaron bajo operación durante 12 horas consecutivas desde las 19 hrs de un día hasta las 7 hrs del día siguiente. La colecta se inició el 4 de julio y finalizó el 3 de agosto de 2005.

Los mosquitos adultos capturados se mantuvieron a una temperatura aproximada de 8°C durante el transporte. En el laboratorio, una vez anestesiados se separaban por sexo y por especie, usando las claves dicotómicas de identificación de Darsie y Ward (1981).²² Los mosquitos de interés se colocaron en viales de 0.5 dram con alcohol al 80% y fueron guardados a -70 °C para ser evaluados como portadores del dengue mediante la técnica RT-PCR.

Para determinar el tipo de distribución de los mosquitos se realizaron las pruebas del vecino más próximo y función K con la extensión Spatial Statistics del programa Arc View 3.2. Se evaluó la presencia del vector asociada con variables sociodemográficas utilizando los datos del Censo Nacional de Población y Vivienda del año 2000 por AGEB relativos a densidad de población, densidad de vivienda, hacinamiento, viviendas con todos los servicios y viviendas con construcción de materiales precarios mediante la prueba no paramétrica de χ^2 usando el paquete estadístico MINITAB v13. La variable mosquito fue dicotómica en presencia y ausencia y las variables sociodemográficas se categorizaron en tres niveles.

La extracción del RNA se realizó con el Kit SuperScript III First-Strand Synthesis System to RT-PCR (Invitrogen). Los mosquitos se homogenizaron con 300 μ L Trizol invitrogen durante 5 min a temperatura ambiente y posteriormente se adicionaron 200 μ L de cloroformo. La muestra fue agitada e incubada a temperatura ambiente durante 10 min, y al cabo de este tiempo se procedió a centrifugar a 12 000 rpm durante 10 min a 4°C. La fase acuosa se recuperó de la fase proteínica y se colocó en un microtubo estéril. El RNA se precipitó por adición de 500 μ L de isopropanol e incubación a 4°C por 10 min. La pastilla de RNA fue lavada con 1 ml de etanol al 75% mediante centrifugación a 7 500 rpm durante 5 min a una temperatura de 4°C. Se decantó el etanol y el precipitado fue mantenido a temperatura ambiente durante 10 min para secar la pastilla de RNA, la cual fue finalmente resuspendida en 50 μ L de agua libre de RNasas. Posteriormente, 2 μ L de RNA total extraído fueron diluidos con 58 μ L de agua estéril para cuantificar a una absorbancia A260nm y A280nm con un espectrofotómetro de luz UV.

Del RNA total, 0.5 μ g fueron colocados en tubos estériles y les fue adicionado 1 μ L de dNTP mix 10mM, 1 μ L de oligo (dT). La reacción fue llevada a 10 μ L ajus-

tando el volumen con agua tratada con Dietil pirocarbonato de sodio (DEPC) e incubada a 65°C durante 5 min. Posteriormente le fue adicionado 2 μ L de Buffer 10X RT, 4 μ L de $MgCl_2$, 2 μ L de DTT 1mM, 1 μ L de inhibidor recombinante de RNasa (RNaseOUT) y 1 μ L de enzima Super Script III a cada tubo e incubado a 50°C durante 50 min. La reacción fue concluida por incubación a 85°C durante 5 min y posteriormente le fue adicionado 1 μ L de RNasa H e incubado durante 20 min a una temperatura de 37°C para continuar con la amplificación de DNA.

La amplificación del cDNA se realizó en tubos para PCR de 0.2 ml, adicionando 12.5 μ L de Master Mix (Buffer de PCR 10X, $MgCl_2$ 0.25 M, dNTP mix 10mM y 2U Taq polimerasa) 1 μ L de primer sentido 20 μ M, 1 μ L de primer en contrasentido 20 μ M, 1 μ L de cDNA llevando a un volumen de 25 μ L con agua destilada.

El cDNA fue amplificado utilizando el siguiente programa: a 94°C durante 3 min, 40 ciclos de incubación a 94°C 30 seg, 70°C 1 min, 72°C 1 min y una extensión final de 72°C por 5 min. Los productos de amplificación fueron analizados electroforéticamente en geles de agarosa al 2 por ciento. Las muestras fueron corridas por migración a 100 voltios durante 30 minutos. El gel se analizó mediante exposición a luz UV utilizando un fotodocumentador EDAS-290 Kodak.

El protocolo de investigación fue sancionado por el Comité de Bioética del Instituto de Ciencias Biomédicas de la Universidad Autónoma de Ciudad Juárez.

Resultados

Fueron capturados un total de 12 913 mosquitos hembra de los cuales 122 correspondieron a la especie *Ae. aegypti*. Solamente 59 de las 419 AGEB muestreadas resultaron positivos para la presencia del vector (figura 1).

Los valores obtenidos para el estadístico del vecino más próximo muestran una distribución en conglomerado del mosquito tanto a escala local ($R=0.247$, $p=0.05$) como a escala regional ($R=-1.2995$ $p=0.05$). La gráfica del análisis de función K determina los 4000m como la distancia óptima de conglomerado (figura 2).

El análisis de χ^2 fue realizado con la intención de explicar alguna causa aparente de la distribución en conglomerado, pero para todas las variables sociodemográficas evaluadas los valores resultaron no significativos (cuadro I).

Muestras de aislamientos de virus del dengue serotipos DENV-1, DENV-2 y DENV-3 fueron utilizadas como virus de referencia en el ensayo de RT-PCR. Los tamaños de los productos de DNA fueron obtenidos para cada virus del dengue después de la amplificación con los primers específicos D1-TS1, D1-TS2 y D1-TS3. En el primer caso el producto estimado

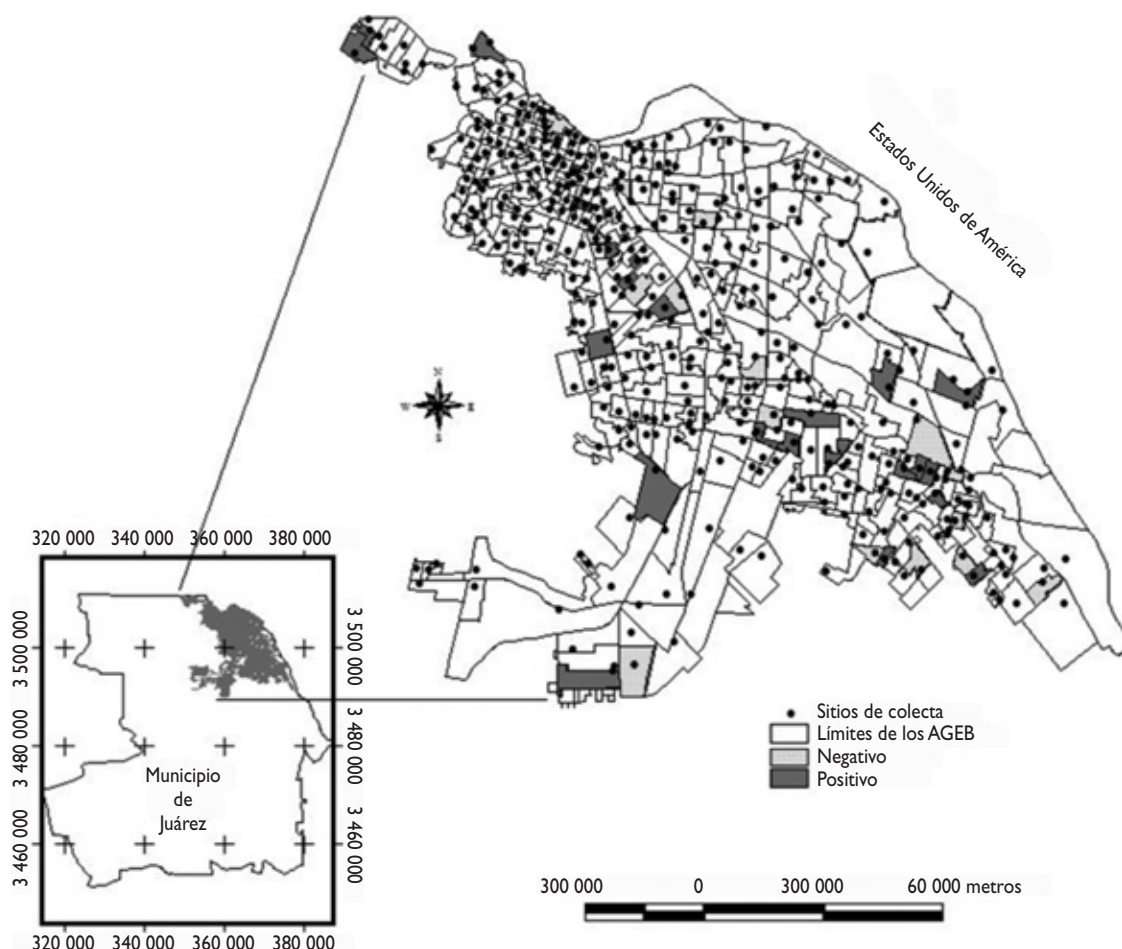


FIGURA 1. DISTRIBUCIÓN DEL MOSQUITO *Aedes aegypti*. LAS ÁREAS GEOGRÁFICAS BÁSICAS DE REFERENCIA MARCADAS EN COLOR OSCURO REPRESENTAN LA PRESENCIA DE MOSQUITOS INFECTADOS CON DENGUE. CIUDAD JUÁREZ, CHIHUAHUA, MÉXICO, 2005

fue de 482 pb, para el segundo caso el producto fue de 119 pb (figura 3) y para el tercer caso el producto fue de 290 pb (figura 4). Se estudiaron un total de 42 muestras, siete de ellas dieron positivo para DENV-2, 10 para el serotipo DENV-3 y siete para ambos.

Discusión y conclusiones

Las características ecológicas y demográficas de Ciudad Juárez, Chihuahua, sugerían la presencia de culicidos de importancia médica. El hallazgo del mosquito tigre *Ae. aegypti* en la ciudad ha dejado una serie de interrogantes dada su importancia en salud pública. Ciudad Juárez, por su ubicación fronteriza, es catalogada como una metrópoli industrial y punto de llegada de personas de lugares tropicales y zonas endémicas de dengue.

Diversos estudios han demostrado la relación entre enfermedades arbovirales y los flujos migratorios,²³ y dado que el virus del dengue se mantiene en la naturaleza mediante un ciclo que involucra solamente al mosquito y al humano,²⁴ no se descarta la probabilidad futura de encontrar casos positivos en humanos si se considera la alta densidad poblacional de esta ciudad. Incluso es posible la presencia de sujetos asintomáticos, no detectados por las autoridades de salud, que representen un riesgo potencial para el resto de la población.

La densidad relativa de *Ae. aegypti* que se obtuvo en el muestreo fue baja, quizás debido a que fue realizado en temporada fuera de lluvias y cuando las temperaturas alcanzan los 40 °C. Estudios en la ciudad de Colima, México, especifican que las temporadas lluviosas y temperaturas menores a 39 °C favorecen la reproducción de

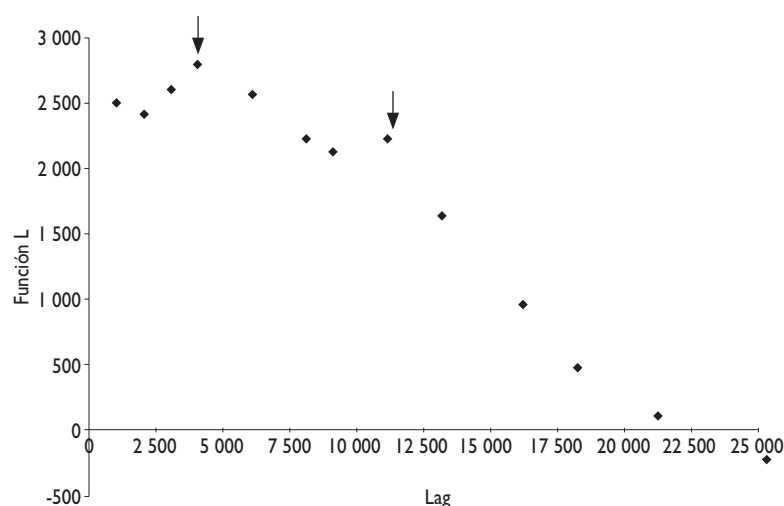


FIGURA 2. REPRESENTACIÓN DE LA PRUEBA DE FUNCIÓN K DE RIPLEY. LAS FLECHAS INDICAN LA DISTRIBUCIÓN EN CONGLOMERADO EN RELACIÓN CON LA DISTANCIA DEL VECINO MÁS PRÓXIMO EN METROS. CIUDAD JUÁREZ, CHIHUAHUA, MÉXICO, 2005

Cuadro I
VALORES DE SIGNIFICANCIA PARA CADA UNA
DE LAS VARIABLES SOCIODEMOGRÁFICAS RELACIONADAS
CON LA PRESENCIA DE *Aedes aegypti* MEDIANTE EL ANÁLISIS
DE χ^2 . CIUDAD JUÁREZ, CHIHUAHUA, MÉXICO, 2005

Variable sociodemográfica	χ^2 calculada	Valor p
Densidad poblacional	2.250	0.325
Densidad de vivienda	2.426	0.297
Hacinamiento	2.986	0.225
Viviendas con todos los servicios	0.057	0.812
Calidad de vivienda	1.962	0.375

dichos mosquitos;²⁵ mientras otros trabajos²⁶ describen que la temperatura promedio para la reproducción y sobrevivencia de *Aedes* es entre 33 y 34 °C.

La presencia de *Ae. aegypti* ha sido relacionada también con variables sociodemográficas. Estudios demuestran que la cantidad de habitantes es una variable a considerar, puesto que los hábitos de *Ae. aegypti* son enteramente antropofílicos, por lo que tiende a desplazarse a aquellas zonas con mayor densidad poblacional; esto hace que aumente el riesgo de transmisión del dengue.²⁷ Si bien la distribución del mosquito *Aedes aegypti* en la ciudad se comportó de manera conglomerada, no fue posible identificar alguna causa de carácter socio-demográfico para ello, ya que las pruebas de asociación entre las variables evaluadas no mostraron correlación

significativa. Es posible que existan otras variables no consideradas, incluyendo factores físicos como la presencia de criaderos artificiales o vegetación adecuada, que expliquen satisfactoriamente la distribución del vector dentro de la ciudad.

Los análisis de PCR fueron realizados utilizando primers para los distintos serotipos.²⁸ Si bien se sabe que en México circulan los cuatro serotipos del dengue, sólo se detectaron los serotipos DENV-2 y DENV-3. Para DENV-2 la banda de amplificación es de 119 pb, que fue localizada en 33.3% de la población total de mosquitos estudiada, aunque en algunas muestras amplificaron más de una banda, lo que puede deberse a la genética *per se* del organismo. Para el DENV-3 se mostró que el control positivo marcaba una sola banda de 290 pb y se presentaba en 40.47% de la población de mosquitos analizada. Al igual que en el caso anterior, algunos organismos mostraron más de una banda. Otras 18 muestras, correspondientes a 43% de las muestras totales analizadas, no presentaron especificidad por ningún tipo de dengue.

De las amplificaciones diagnosticadas como positivas para DENV-2 y DENV-3, se detectaron siete muestras en las que se presentan ambos serotipos (16.625%), lo cual refuerza datos reportados en otros estudios²⁹ donde se menciona que esta interacción dual se debe a la larga vida del vector, donde puede infectarse con dos o más serotipos al picar enfermos infectados con diferentes virus del dengue y ser capaz de transmitirlo a personas susceptibles.

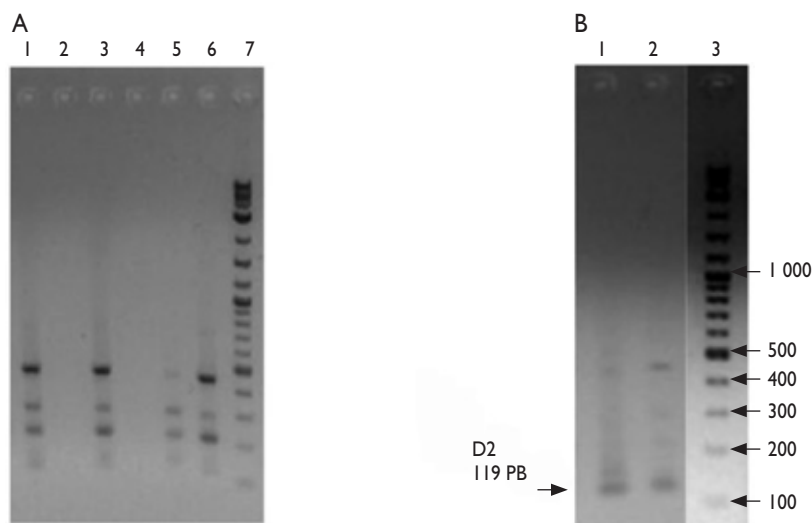


FIGURA 3. ANÁLISIS ELECTROFORÉTICO DE RT-PCR CON GEL DE AGAROSA AL 2%. PANEL A CARRILES 1, 3, 5, 6 CON MUESTRAS POSITIVAS PARA SEROTIPO 2. CARRILES 2 Y 4 MUESTRAS NEGATIVAS. CARRIL 7 MARCADOR DE PESO MOLECULAR. PANEL B CARRIL 1 Y 2 CONTROL POSITIVO D2, CARRIL 3 MARCADOR DE PESO MOLECULAR. CIUDAD JUÁREZ, CHIHUAHUA, MÉXICO, 2005

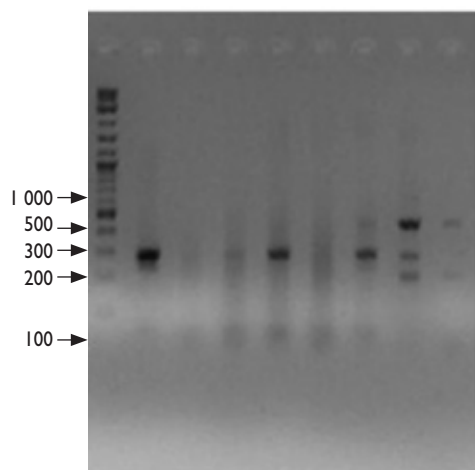


FIGURA 4. ANÁLISIS ELECTROFORÉTICO DE RT-PCR CON GEL DE AGAROSA AL 2%. CARRIL 1 MARCADOR DE PESO MOLECULAR, CARRIL 2 CONTROL POSITIVO D3. LOS CARRILES 3, 6 Y 9 SE CONSIDERAN POSITIVOS. LOS CARRILES 4, 5, 7 Y 8 FUERON NEGATIVOS. CIUDAD JUÁREZ, CHIHUAHUA, MÉXICO, 2005

Las técnicas moleculares para el diagnóstico del virus del dengue fueron específicas y permitieron discernir entre organismos infectados y no infectados por el virus. El 57% de las muestras resultaron infectadas, lo

que representa un potencial peligro como transmisores del virus.

La vigilancia del dengue puede realizarse de diversas maneras, aunque el sistema más efectivo e importante se basa en dos componentes: diagnóstico serológico y virológico en laboratorio y el monitoreo entomológico sobre el vector. En relación con el primer componente, y no obstante la limitante en cuanto al costo, la técnica RT-PCR demostró su eficacia en la búsqueda activa de serotipos circulantes en el área de estudio considerada como no endémica para la enfermedad. En cuanto a la vigilancia entomológica, la implementación de técnicas geoespaciales proporcionó información útil para acciones futuras de control del vector.

Se recomienda establecer la vigilancia epidemiológica en humanos que permita realizar un diagnóstico temprano, con la finalidad de evitar la presencia de la enfermedad, además de informar y concientizar a la población en general de los posibles riesgos.

Referencias

1. Regis L, Monteiro AM, Varjal MA, Silveira JC, Freire A, Veiga R, et al. Developing new approaches for detecting and preventing *Aedes aegypti* population outbreaks: basis for surveillance, alert and control system. Mem Inst Oswaldo Cruz 2008;103:50-59.

2. Salvatella AR. *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus* (diptera, culicidae) y su papel como vectores en las Américas. La situación de Uruguay. *Rev Med Uruguay* 1996; 12: 28-36.
3. Caballero R, Torres T, Chong F, Pineda A, Altuzar M, López B. Concepciones culturales sobre el dengue en contextos urbanos de México. *Rev Saude Publica* 2006; 40: 126-133.
4. Gubler DJ. The emergence of epidemic dengue fever and dengue hemorrhagic fever in the Americas: a case of failed public health policy. *Pan Am J Public Health* 2005; 17: 221-224.
5. Danis-Lozano R, Rodríguez MH, Hernández-Avila M. Gender-related family head schooling and *Aedes aegypti* larval breeding risk in Southern Mexico. *Salud Publica Mex* 2002; 44: 237-242.
6. Martínez-Torres E. Dengue. *Estudios avanzados* 2008; 22: 33-52.
7. Wichmann O, Gascon J, Schunk M, Puente S, Siikamäki H, Gjörup I et al. Severe dengue virus infection in travelers: risk factors and laboratory indicators. *J Infect Dis* 2007; 195: 1089-1096.
8. Salazar MI, Richardson JH, Sánchez-Vargas I, Olson KE, Beaty BJ. Dengue virus type 2: replication and tropisms in orally infected *Aedes aegypti* mosquitoes. *BMC Microbiology* 2007; 7: 9.
9. World Health Organization. Dengue haemorrhagic fever: diagnosis, treatment, prevention and control. 2nd ed. Ginebra, Suiza. World Health Organization, 1997. [Consultado 2008 noviembre 7]. Disponible en: <http://www.who.int/csr/resources/publications/dengue/Denguepublication/en/print.html>
10. World Health Organization. Dengue and dengue haemorrhagic fever. Ginebra, Suiza: WHO, 2008.
11. Guzmán MG, Kouri G. Dengue: an update. *Lancet Infect Dis* 2002; 2: 33-42.
12. Cáceres RO. Detección rápida de los serotipos del virus del dengue en el mosquito *Aedes aegypti*. *Rev Peru med exp salud publica* 2003; 20: 156-158.
13. Tewari SC, Thenmozhi V, Katholi CR, Manavalan R, Munirathinam A, Gajanana A. Dengue vector prevalence and virus infection in a rural area in south India. *Tropical Medicine and International Health* 2004; 9: 499-507.
14. Marquetti MC, González D, Aguilera L, Navarro A. Índices ecológicos en el sistema de vigilancia de *Aedes aegypti* (díptera: culicida) en Cuba. *Rev Cubana Med Trop* 1999; 51: 79-82.
15. Vezzani D, Velázquez SM, Soto S, Schweigmann NJ. Environmental characteristics of the cemeteries of Buenos Aires City (Argentina) and infestation levels of *Aedes aegypti* (diptera: culicidae). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2001; 96: 467-471.
16. Kouri G. El dengue, un problema creciente de salud en las Américas. *Rev Panam Salud Publica* 2006; 19: 143-145.
17. Ramírez-Zepeda MG, Velasco-Mondragón HE, Ramos C, Peñuelas JE, Maradiaga-Ceceña MA, Murillo-Llanes J, et al. Caracterización clínica y epidemiológica de los casos de dengue: experiencia del Hospital General de Culiacán, Sinaloa, México. *Rev Panam Salud Publica* 2009; 25: 16-23.
18. Lloyd LS. Best practices for dengue prevention and control in the Americas. Strategic report. Environmental Health Project Office of Health Infectious Diseases and Nutrition. EHP strategic paper. US Agency for International Development. Washington, DC: US Agency for International Development, 2003.
19. De la Mora-Covarrubias A, Rubio-Arias HO, Jiménez-Castro JA. Vigilancia entomológica de *Culex quinquefasciatus* say, 1823, vector de enfermedades arbovirales en la zona urbana de Ciudad Juárez, Chihuahua, México. *Universidad y Ciencia* 2007; 24: 101-109.
20. Pinheiro CS, Tadei WP, Barros SS, Vasconcelos FC, Cruz CR. Detection of dengue virus serotype 3 by reverse transcription-polymerase chain reaction in *Aedes aegypti* (diptera, culicidae) captured in Manaus, Amazonas. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2005; 100: 833-839.
21. Instituto Nacional de Estadística y Geografía. II Censo de población y vivienda. Principales resultados por localidad, Chihuahua, 2005. [Consultado 2009 enero 23]. Disponible en: http://www.inegi.gob.mx/est/contenidos/espanol/metodologias/censos/sm_censo.pdf
22. Darsie R, Ward R. Identification and geographical distribution of the mosquitoes of North America, North of Mexico. USA: The American mosquito control association, 1981.
23. Romaña C, Emperaire L, Jansen AM. Enfoques conceptuales y propuestas metodológicas para el estudio de las interacciones entre el medio ambiente y la salud: aplicación a un programa de investigación sobre la tripanosomiasis americana. *Cad Saude Publica* 2003; 19: 945-953.
24. Clarke KC, McLafferty SL, Tempalski BJ. On epidemiology and geographic information systems: a review and discussion of future directions. *Perspectives* 1996; 2: 85-92.
25. Espinoza F, Hernández CM, Coll R. Factores que modifican los índices larvarios de *Aedes aegypti* en Colima, México. *Rev Panam Salud Publica* 2001; 10: 6-12.
26. Nagao Y, Thavara U, Chitnumsup P, Tawatsin A, Chansang C, Campbell LD. Climatic and social risk factors for *Aedes* infestation in rural Thailand. *Tropical Medicine and International Health* 2003; 8: 650-659.
27. Bottinelli OR, Marder G, Ulón S, Ramírez L, Sario HR. Estratificación de áreas de Riesgo-Dengue en la ciudad de Corrientes mediante el uso de los Sistemas de Información Geográfico (SIG). Corrientes, Argentina: UNNE, 2002.
28. Lanciotti RS, Calisher CH, Gubler DJ, Chang GJ, Vorndam AV. Rapid detection and typing of dengue viruses from clinical samples by using reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1992; 30: 545-551.
29. Cáceres O. Detección rápida de los serotipos del virus del dengue en el mosquito *Aedes aegypti*. *Rev Peru med exp salud publica* 2003; 20: 156-158.