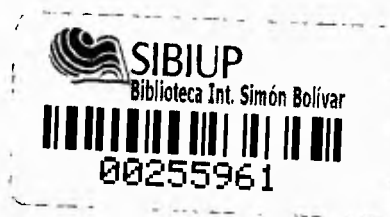


UNIVERSIDAD DE PANAMA
MAESTRIA EN ENTOMOLOGIA MEDICA



SUSCEPTIBILIDAD DEL
Aedes aegypti
EN LA CIUDAD DE PANAMA
AL VIRUS DENGUE-1

TERESITA SOLANO

REPUBLICA DE PANAMA

AGOSTO 1989

T.M.V.

OCT 23 1989

Obs. del autor

237981

SUSCEPTIBILIDAD DEL *Aedes aegypti* EN LA CIUDAD DE
PANAMA AL VIRUS DENGUE-1

TESIS

Sometida a consideración del Jurado Calificador para optar
al título de **Magister en Ciencias** con especialidad en
Entomología Médica

VICERRECTORIA DE INVESTIGACION Y POSTGRADO

DIRECCION DE POSTGRADO

Aprobado

<i>Bedej E. Dutary</i>	-----	ASESOR
<i>Paulina J. de Casanova</i>	-----	COMITE
<i>Eustorgio Méndez</i>	-----	COMITE
<i>Ramón Ojeda</i>	-----	COMITE

TABLA DE CONTENIDO

	Páginas
DEDICATORIA.....	i
AGRADECIMIENTO.....	ii
RESUMEN.....	iii
SUMMARY.....	iv
1. INTRODUCCION.....	1
2. REVISION DE LITERATURA.....	6
2.1. Taxonomía.....	6
2.2. Origen.....	8
2.3. Biología.....	11
2.3.1. Huevos.....	11
2.3.2. Larvas.....	12
2.3.3. Pupas.....	14
2.3.4. Adultos.....	16
2.3.5. Apareamiento.....	19
2.3.6. Oviposición.....	20
2.3.7. Longevidad.....	21
2.3.8. Papel como vector.....	21
2.4. Dengue.....	26
3. SEGURIDAD EN EL LABORATORIO.....	33

4.	MATERIALES Y METODOS.....	37
4.1.	Mosquitos.....	37
4.1.1.	Colecta.....	37
4.1.2.	Mantenimiento en el insectario.....	39
4.2.	Virus.....	40
4.3.	Infección de los mosquitos con el virus DEN-1.....	41
4.4.	Detección de dengue en <i>Ae.aegypti</i>	45
4.4.1.	Preparación de controles.....	45
4.4.2.	Preparación de las muestras.....	47
4.4.3.	Inoculación de suspensiones de tórax y abdomen de <i>Ae.</i> <i>aegypti</i> en células de mosquito..	47
4.4.4.	Inmunofluorescencia indirecta...	51
5.	RESULTADOS Y DISCUSION.....	57
6.	CONCLUSIONES.....	70
7.	LITERATURA CITADA.....	71

DEDICATORIA

A MIS PADRES Y HERMANOS

AGRADECIMIENTO

Quiero expresar mi mas sincero y profundo agradecimiento a la Dra. Bedsy Dutary por su paciencia, amistad y apoyo incondicional durante la elaboración de este estudio.

Al Dr. Jorge Arias por su constante estímulo, dedicación, dinamismo, apoyo y desinteresada amistad.

Un agradecimiento muy especial a la Dra. Paulina Carreira, Dra. Pauline Peralta, Dr. Eustorgio Méndez, Dr. Michael Nelson y Dr. Jack Petersen, por sus valiosas correcciones y comentarios.

A mis buenos amigos Astrid de Quirós, Jorge Rozette y Ramón Ocegüera por el constante apoyo, estímulo y amistad brindada en todo momento, ya que hicieron de mi estadía en Panamá un momento muy especial.

Al personal del Laboratorio Conmemorativo Gorgas por la ayuda prestada durante la realización de este proyecto, en especial a la Lic. Gladys Oro, al Lic. Eduardo Vásquez, a los Sres. Enrique London y Julio Cisneros y a la Sra Lidia de Mann.

Finalmente agradezco profundamente a la Organización Panamericana de la Salud el apoyo económico brindado durante la realización de mis estudios en Panamá.

SUSCEPTIBILIDAD DE *Aedes aegypti* EN LA CIUDAD DE PANAMA AL
VIRUS DENGUE-1

RESUMEN

Panamá fué reinfestada con el *Ae.aegypti* en julio de 1985. Desde entonces el mosquito se ha diseminado por todo el área metropolitana. No se ha logrado determinar con exactitud la procedencia del *Ae.aegypti* que ha infestado a Panamá y por lo tanto se desconoce la susceptibilidad de esta cepa del mosquito al virus dengue (DEN). En octubre 1988, el Laboratorio Conmemorativo Gorgas (LCG) procedió a probar la susceptibilidad del mosquito al virus DEN-1 que es el que esta circulando en el Caribe, Centro y Sur América.

Se colectaron larvas de *Ae.aegypti* de 1°-3° estadio en cuatro áreas de la ciudad (Norte, Noreste, Sureste y Suroeste). Las larvas se mantuvieron bajo condiciones óptimas de laboratorio hasta completar su desarrollo. Las hembras chuparon sangre de ratones vivos tres días después de emerger, a los que se les había inyectado DEN-1 (Jamaica strain, 1977 pasado en mosquitos *Toxorhynchites*) en dosis diferentes. Los ratones circularon 1000, 100 y 10 partículas virales por 3 μ l (pv/3 μ l) durante una hora en que chuparon las hembras. Las hembras que chuparon hasta llenarse fueron regresadas a 28°C; el 50% se mantuvo durante siete días y el 50% restante hasta completar 12 días. Las cabezas de las hembras fueron analizadas para positividad de DEN-1 con técnicas de inmunofluorescencia indirecta, utilizando anticuerpos (Ac) monoclonales. Los cuerpos de las hembras fueron sonificados e inoculados en células de mosquito *Toxorhynchites amboinensis* (TRA-284) para observación de efecto citopático.

En total se revisaron 792 hembras; 7% (14/198) fueron positivas al infectarse con la sangre de ratones circulando 10 pv/3 μ l, 7% (10/136) con 100 pv/3 μ l y 46% (210/458) con 1000 pv/3 μ l. Estos resultados indican alta susceptibilidad de la cepa y fueron comparados con los expresados en la literatura.

SUSCEPTIBILITY OF *Ae.aegypti* TO DENGUE-1 IN PANAMA.

SUMMARY

Panama City was reinfested with *Ae.aegypti* in July 1985 and by mid 1988 were found in every borough of the Metropolitan area. The origin of the mosquito has not been determined and therefore the vectorial capacity of this mosquito strain to dengue (DEN) virus is unknown. In October 1988, Gorgas Memorial Laboratory (GML) initiated susceptibility studies of Panama *Ae.aegypti* to DEN-1 which was selected because it is the virus present in the Caribbean and Central and South America. *Ae.aegypti* larvae were collected (1st-3rd instar) from four different city areas and maintained under standard laboratory conditions. Three days after emergence, females were fed on live mice, injected with three different high titered doses of DEN-1 (Jamaica strain-1977 passed three times in *Toxorhynchites*). The injected mice circulated 10, 100 and 1000 pfu/3 μ l during one hour. Each female engorged an average of 3 μ l of blood per meal, were divided in two groups and maintained at 28°C. The first group was harvested at day seven post-feeding while group two was harvested on day 12 post-feeding. Head squash preparations were examined by indirect fluorescent antibody test using monoclonal antibodies, while the thorax and abdomen were sonicated and inoculated into mosquito cell line *Toxorhynchites amboinensis* (TRA-284) to observe cytopathic effects. The total number of females examined was 792; 7% (14/198) were positive after feeding on a mouse circulating 10 pfu/ μ l of DEN-1, 7% (10/136) after feeding on 100 pfu/3 μ l infected blood and 46% (210/458) after feeding on 1000 pfu/3 μ l. The susceptibility of *Ae.aegypti* in Panama to DEN-1 virus was compared to reports of the susceptibility of this mosquito in other countries.

1. INTRODUCCION

El mosquito *Aedes aegypti* (Linneaus) es uno de los vectores del virus dengue. La susceptibilidad a éste virus varía entre las distintas cepas geográficas de *Ae.aegypti*, también varía su habilidad para transmitir el virus a huéspedes vertebrados (Gubler et al., 1979). El concepto de variaciones en susceptibilidad dentro de una misma especie es relativamente reciente (Mitchell et al., 1980); y solo ha sido estudiado en algunos mosquitos y con ciertos arbovirus como Chikungunya (Tesh et al., 1976); Encefalitis Japonesa (Rosen et al., 1985); La Crosse (Grimstad et al., 1977); Fiebre Amarilla (Lorenz et al., 1984) y dengue.

La reinfestación de la ciudad de Panamá con *Ae.aegypti* durante 1985 y los altos índices de infestación del mosquito en 1988 (Dutary et al, 1988), nos estimularon a diseñar un estudio para determinar cuan susceptible al virus dengue-1 es la cepa de *Ae.aegypti* reintroducida en Panamá.

Los resultados de este estudio serían útiles porque una cepa muy susceptible del mosquito podría ser capaz de iniciar y sostener un brote en Panamá; el 97% de la población panameña carece de anticuerpos (Ac) antidengue

(Peralta, 1967); la última epidemia ocurrió en 1942 (Rosen, 1958).

Ae. aegypti, transmisor de dengue, fiebre amarilla urbana y de otras infecciones virales, pertenece al subgénero *Stegomyia* (Theobald, 1901), que incluye otras especies cuya distribución natural está restringida al Viejo Mundo. (Forattini, 1965). Los ejemplares adultos de este grupo se presentan frecuentemente con manchas y diseños de escamas claras y oscuras en las patas y el tórax.

Se cree que el mosquito *Ae. aegypti* es originario de Africa, de donde fue transportado al Nuevo Mundo en barriles de agua en los barcos durante las exploraciones y colonizaciones europeas (Nelson, 1986).

Es una especie de las regiones tropicales y subtropicales del globo, dentro de los límites de 35° latitud norte y 35° latitud sur, que corresponde a una isotérmica de verano de 10°C. La distribución de *Ae. aegypti* está limitada por la altitud; sin embargo, la forma urbana se ha registrado hasta los 2,200 metros sobre el nivel del mar en Colombia (Suarez y Nelson, 1981).

Es una especie predominantemente doméstica que infesta recipientes naturales o artificiales y se encuentran en las viviendas o en sus alrededores.

Esta especie presenta una metamorfosis completa : huevo, cuatro estadios larvales, un estadio de pupa y el adulto (Christophers, 1960).

Las hembras se alimentan de néctar y chupan sangre de la mayoría de los vertebrados, pero muestran una marcada preferencia por la humana. La alimentación sanguínea se lleva a cabo durante el día, en las primeras horas de la mañana y al atardecer, presentándose ondas de actividad intermedia, que pueden variar de acuerdo a la estación del año (Yasuno, 1970).

Los adultos de *Ae.aegypti* viven de tres a cuatro semanas en su ambiente natural; en el laboratorio pueden permanecer vivos de tres a cuatro meses (Nelson, 1986).

En las Américas el dengue es transmitido exclusivamente por el mosquito *Ae.aegypti*, en países asiáticos otras especies del género *Aedes* también transmiten la enfermedad.

Bancroft, en 1906 dio a conocer la primera prueba de que el mosquito *Ae.aegypti* era el vector del dengue (Rivers, 1965).

El dengue clásico es una enfermedad viral que se manifiesta con fiebre de cinco a siete días, anorexia, dolor de cabeza, dolores musculares y articulares con o sin erupción maculopapular. Esta enfermedad ha atacado al hombre por varios siglos, presentándose en forma de

epidemias que afectan a todos los estratos sociales causando miles de enfermos y en casos de dengue hemorrágico, la muerte.

El huésped natural del virus es el hombre, pero los monos también pueden infectarse, ya sea por picadura del mosquito o por inoculación artificial en el laboratorio, sin embargo en los monos no se produce enfermedad clínica, aunque éstos desarrollan viremia de pocos días de duración (Harrison et al., 1977, Scherer et al., 1978).

Algunas de las epidemias más notables se desencadenaron en Estados Unidos, Australia, Grecia y Japón a partir de 1920 (Rivers, 1965).

En la actualidad, los virus de dengue son endémicos en la mayoría de los países de Asia Tropical y en Africa Oriental y Occidental. A partir de 1971, gran parte de Polinesia y más recientemente de Micronesia, han sufrido epidemias de la enfermedad (Benenson, 1980).

En las dos últimas décadas la actividad del dengue en las Américas ha aumentado considerablemente. Aunque el dengue clásico rara vez es fatal, se han presentado pandemias que han causado altas tasas de morbilidad. Desde 1977 hasta 1989, el dengue se ha extendido por los países del Caribe, Centro, Norte y Sur América (OPS, 1989).

Las epidemias de dengue pueden ocurrir dondequiera que se encuentre el vector, exista una población susceptible, y se introduzca el virus, tanto si se trata de zonas urbanas como rurales (Monath, 1988).

Este estudio utiliza nuevas técnicas para estudiar la competencia vectorial en mosquitos, los resultados obtenidos son novedosos, y nos ha permitido cuantificar el número de partículas virales capaces de infectar al *Ae.aegypti* presente en la ciudad de Panamá.

2. REVISION DE LITERATURA

2.1 TAXONOMIA

Ae.aegypti pertenece al sub-género *Stegomyia* Theobald, 1901. En Africa el grupo representante de éste sub-género consta de alrededor de 32 especies, designado como Grupo A o *aegypti* grupo Edwards 1932, (Huang, 1977). Todas las especies del Grupo A están confinadas a la región Etiópica, con una sola excepción, *Ae.aegypti* que es originario de Africa en donde puede ocurrir como una forma selvática. Sin embargo, representantes de esta especie han sido domesticados y diseminados a través del mundo tropical por el hombre. Actualmente, *Ae.aegypti* es tropicopolita, y su presencia fuera de Africa se ha atribuido a la introducción humana a través del tiempo (Craig y Hickey, 1967).

Los adultos de este mosquito varían considerablemente en lo que se refiere a su coloración general. Las formas extremas corresponden a especímenes con el tórax y el abdomen recubiertos de escamas pálidas, otras formas son oscuras con manchas claras dispuestas sobre un fondo negro. Entre estos dos tipos se reconoce una amplia gama de transiciones, lo que motivó en épocas pasadas numerosas

descripciones que aumentaron la lista de sinónimos de esta especie (Forattini, 1965).

Basado en las características de las tonalidades del tórax, abdómen y patas se reconocen tres tipos:

Ae. aegypti ssp. formosus (Walker): forma geográficamente representativa confinada en el Continente Africano al sur del desierto de Sahara, presenta una coloración oscura, sin escamas pálidas en el primer tergito abdominal, no se encuentra en las zonas costeras, es dependiente de la lluvia, ya que le proporciona criaderos para sus formas inmaduras, presenta marcada estacionalidad.

Durante la estación seca puede penetrar a las casas y ovipositar en sitios de almacenamiento de agua, raramente se alimenta del hombre en el interior de las casas y solo ocasionalmente fuera de ellas, es autógeno facultativo (Trips, 1977).

Ae. egypti forma tipo: presenta una coloración variable, es una forma intermedia, más clara que la anterior, presenta escamas pálidas en el primer tergito abdominal, en Africa al sur del Sahara esta forma es enteramente costera, excepto en algunas áreas de penetración. En el Nuevo Mundo su distribución también es costera.

Sus criaderos están en el interior de las casas, en los depósitos de almacenamiento de agua, no es dependiente de la lluvia y se cría activamente durante todo el año.

Ae. aegypti var. *queenslandensis*: descrita por Theobald en 1901 en el norte de Australia; aquí se incluyen todos los tipos que presentan características variables, tales como manchas de escamas oscuras en el mesonoto, variando de tonalidad desde marrón hasta casi blanco, bandas claras en la base de los tergitos abdominales que se prolongan en la región abdominal, las patas pueden presentar escamas claras esparcidas en sus áreas oscuras.

Es común en las partes secas del Mediterráneo, India, Australia y en el Nuevo Mundo. En Africa la distribución de esta variedad es semejante a la forma tipo, incluyendo ciertas zonas de penetración, lo cual por su forma de distribución hace evidente que es una forma introducida (Mattingly, 1957.; Mattingly, 1958).

2.2 ORIGEN

Las evidencias sugieren que este culicino es originario de la región Etiópica, ya que es en esa zona faunística donde se encuentra el mayor número de representantes del sub-género *Stegomyia* y donde habitan las especies mas estrechamente relacionadas con el

Ae.aegypti. Mas aún, el caracter primitivo de éste y el encontrado en condiciones naturales en el Continente Africano, independientes del contacto humano, son poderosos argumentos que sustentan ésta evidencia (Forattini, 1965).

Existen varias teorías que tratan de explicar el origen de *Ae.aegypti*:

- En algunas partes del oeste de Africa (al norte de Nigeria), con estaciones alternas, secas y húmedas, existen poblaciones de *Ae.aegypti* que son capaces de permanecer activas durante la estación seca, formando sus criaderos en depósitos de agua hechos por el hombre. La estación seca condiciona la selección de individuos resistentes a desecación, endofílicos y estrechamente asociados con humanos. Esta forma doméstica fué transportada del oeste de Africa al Medio Este por el comercio existente en la región, cerca de 850-1300 años D.C (Davidson, 1969 EN: Petersen, 1977).

- Otra teoría existente es que en tiempos de sequía ha sido posible para el *Ae.aegypti* extender su rango hacia el Medio Este. En soporte de ésta teoría existen evidencias arqueológicas que indican que entre los años 1500-3500 A.C. el desierto de Sahara era verde, gradualmente se fué secando, y se convirtió en un medio de selección efectivo de resistencia e incremento en la

dependencia hacia los depósitos de agua humanos. La sequedad del desierto aisló la población de *Ae.aegypti* del Medio Este de la del resto de Africa, permitiendo desarrollar alelos nuevos en cada población, quedando una población confinada al sur del Sahara y la otra a las zonas costeras, en donde, bajo presión selectiva desarrolló características de domesticidad, antropofilia, anautogenia y preferencia de oviposición.

Este modelo propuesto de dos formas de población aislada, indica que originalmente derivan de un cepa ancestral común. Durante este período de aislamiento se acumularon características que tendieron a reducir el flujo de genes entre ellas (Lhote, 1959 ; Ormerod, 1976 EN: Petersen, 1977).

Se concluye que *Ae.aegypti* ssp. *formosus* está mas estrechamente relacionado a la cepa ancestral que la forma tipo. Consecuentemente la forma tipo es considerada una forma evolucionada más recientemente (Petersen, 1977).

2.3 BIOLOGIA

2.3.1 HUEVO

Los huevos de *Ae.aegypti* miden alrededor de 1 mm de largo, poseen forma ovalada, aguzados en sus extremos, son depositados en forma individual sobre el nivel del agua, adheridos a la pared del criadero o pueden ser depositados directamente sobre el agua (Forattini, 1965; Nelson, 1986). Inicialmente los huevos son blancos; en un lapso aproximado de dos horas se tornan negro brillante (O'Connor, 1923 En: Christophers, 1960 ; Mirsa, 1960).

El desarrollo embrionario se completa en 48 horas bajo condiciones óptimas de temperatura y humedad; a bajas temperaturas éste período se puede extender (Christophers, 1960).

Una vez que este período se ha completado, el huevo es capaz de presentar resistencia prolongada a condiciones desfavorables del medio tal como desecación, que se puede prolongar en algunas ocasiones a más de un año. Esto ayuda a explicar la posibilidad de la diseminación del mosquito por diferentes áreas geográficas, mediante el transporte de huevos en recipientes secos a largas distancias. Los huevos al ponerse en contacto con el agua, pueden eclosionar varios minutos después, presentándose como una

forma de dispersión activa (Clements, 1963; Forattini, 1965).

El huevo es la etapa de mayor resistencia del ciclo biológico; en las regiones donde las estaciones anuales son bien marcadas, representa el medio principal de que las especies disponen para soportar los rigores del invierno (Forattini, 1965).

2.3.2 LARVAS

Se encuentran en una gran variedad de habitats acuáticos, en aguas poco profundas, con o sin vegetación emergente y aguas contaminadas con o sin materia orgánica, pero comunmente se desarrollan en aguas conteniendo microflora y fauna, restos de origen animal y plantas (Clements, 1963).

En general las larvas son omnívoras e ingieren partículas y material suspendido en el medio, dentro de cierto rango de tamaño. Las larvas no discriminan entre tipos de alimento particulado (Dadd, 1968).

Rashed en 1989, realizó un estudio comparativo con tres especies de mosquitos; las larvas de *Ae.aegypti* demostraron ser las más rápidas en ingerir alimento. En las tres especies la velocidad de ingestión fue dada en función de la edad de las larvas, temperatura del agua y

la duración del período de ayuno, pero de la densidad larval. Los estadios más jóvenes comieron más rápido que los más viejos.

Ae.aegypti presenta cuatro estadios larvales, los tres primeros se desarrollan rápidamente, pero el cuarto estadio toma más tiempo porque hay incremento en el tamaño y en el peso. La duración del desarrollo larval depende de la temperatura, disponibilidad de alimento y densidad larval en el receptáculo (Nelson, 1986).

Bajo condiciones óptimas el período de desarrollo hasta pupa dura alrededor de cuatro días, pero puede extenderse desde siete hasta 14 días. A bajas temperaturas y escasez de alimento el cuarto estadio larval puede durar varias semanas antes que la pupación ocurra. A altas temperaturas la maduración se acelera, pero produce adultos pequeños (Horsfall, 1955).

Las larvas pueden sobrevivir fuera del agua por varios días, sobreviven en tierra húmeda durante 13 días y maduran cuando son puestas en agua, mientras que otras colocadas en papel filtro seco mueren en nueve horas (Horsfall, 1955.; Mirsa, 1960).

Es característico de las larvas de *Ae.aegypti* presentar fototropismo negativo, extrema sensibilidad a las vibraciones y a la luz, desplazándose al fondo del

recipiente al punto donde la intensidad de luz sea menor (Christophers, 1960).

Presentan un característico movimiento serpentiforme; en posición de reposo se mantienen en forma vertical con respecto a la superficie del agua.

Morfológicamente se diferencian por poseer dos espinas prominentes a cada lado del tórax. En el octavo segmento abdominal presenta en el peine de siete a doce escamas, cada una tiene una espina media y dientes laterales, poseen un sifón corto (Carpenter, 1955).

En cuanto al habitat, en Africa comunmente se encuentran en huecos de árboles y áreas pantanosas, pero en otras partes del mundo son encontradas primariamente en recipientes utilizados por el hombre y secundariamente en recipientes naturales (Tinker, 1974).

2.3.3 PUPAS

No se alimentan, su función es la metamorfosis del estado larval al estado adulto, reaccionan a estímulos externos tales como vibraciones desplazándose activamente por el fondo del recipiente (Nelson, 1986).

El tiempo de desarrollo equivale a un promedio de dos días; este plazo puede acortarse o alargarse según las condiciones de temperatura. Las pupas de las cuales se

originan los machos desarrollan más rápidamente que las de las hembras, al igual que existe un marcado dimorfismo sexual, siendo las pupas de los machos más pequeñas que las hembras (Mirsa, 1960.; Vargas, 1968).

Las pupas poseen un espacio de aire ventral en donde existe gas necesario para la flotación, y mantener su posición normal en la interfase agua-aire y facilitar la emergencia del adulto.

Bajo condiciones de emergencia forzada y espontánea, pierde su flotabilidad y excede la densidad del agua permitiendo sumergirse; al contacto con la atmósfera resulta en una recuperación inmediata en la flotabilidad. Estos cambios en la flotación se considera son causados por cambios en el volúmen y presión de gas en el sistema traqueal (Romoser, 1975).

Las pupas de *Ae.aegypti* se pueden desarrollar exitosamente en terreno húmedo, dando lugar a la salida de los adultos; esta adaptación le da gran ventaja para sobrevivir en casos de desecación (Mirsa, 1960).

En cuanto a su morfología las trompetas respiratorias son cortas y cilíndricas; en el ápice de cada paleta natatoria posee una cerda, y en los vértices sub-apicales de los segmentos abdominales del dos al seis poseen cerdas robustas y desarrolladas (Christophers, 1960).

2.3.4 ADULTOS

Ae.aegypti es un mosquito oscuro con escamas blancas en la base de los segmentos tarsales; en la superficie dorsal del tórax posee el característico diseño de lira formada por escamas plateadas. Los palpos son cortos con escamas plateadas; el clipeo presenta escamas anchas plateadas.

En el abdomen, lateralmente presenta escamas plateadas basales en forma punteada (Carpenter, 1955; Christophers, 1960)

En Africa se reconocen tres poblaciones de *Ae.aegypti* de acuerdo a las características de los habitats en donde se desarrollan: doméstico, peridoméstico y selvático (Mattingly, 1957; Trips, 1975).

En América el concepto establecido es que los adultos de *Ae.aegypti* son esencialmente domésticos, frecuentan la habitación humana en donde las hembras ejercen hematofagia con elevada antropofilia. También pueden atacar una gran variedad de animales dependiendo de la oportunidad que ofrezcan para hacerlo. El ambiente doméstico ofrece sitios de reposo y protección contra condiciones adversas del medio. (Forattini, 1965).

El macho se alimenta de sustancias azucaradas al igual que las hembras, pero éstas necesitan ingerir sangre

para el desarrollo de los ovarios. Pueden tomar sangre de aves o mamíferos silvestres, domésticos y de laboratorio, pero evidentemente prefieren la sangre del hombre (Carpenter, 1955; Gouck, 1972).

El mosquito se alimenta durante las horas del día; posee dos picos de actividad, uno temprano en la mañana y otro durante la tarde, en donde el mosquito presenta mayor actividad (Trips, 1971.; Nelson, 1978). En estudios realizados en Tanganyika se encontró que *Ae.aegypti* además de presentar actividad diurna, posee dos picos de actividad nocturna, uno entre nueve y diez de la noche, y otro entre las tres y cuatro de la madrugada, lo cual ha sido corroborado por otros autores (Lumsden, 1957).

Los mosquitos atacan suavemente, por lo general cerca de los tobillos, codos, parte trasera de las rodillas y cuello (Halstead, 1984).

Se ha visto que existen diferencias marcadas en la respuesta a varios estímulos (CO_2 , ácido láctico) entre las clases de *Ae.aegypti*; la variación en la intensidad de la respuesta, se debe a variaciones en el estado fisiológico de los mosquitos, así como a variaciones en los estímulos externos (Gouck, 1972; Bar-Zeev et al, 1977).

Basados en diferentes pruebas de laboratorio, muchos investigadores concluyen que el CO_2 es primariamente un

activador y no un atrayente hacia el mosquito (Mayer y James, 1970).

Se ha visto que los principales atrayentes del mosquito hacia el huésped son los olores emanados por éste, entre ellos el ácido láctico, producto de las emanaciones de la piel (Bar-Zeev et al, 1977).

El efecto que ejerce la temperatura y humedad sobre los hábitos de alimentación de *Ae.aegypti* es importante. A bajas temperaturas cerca del punto letal, el mosquito se vuelve torpe e incapaz de volar; la temperatura a la cual el insecto cesa de picar comunmente está dada a los 15°C.

A temperaturas superiores a los 35°C y 83% de humedad relativa (H.R.), los mosquitos no pican. Las condiciones óptimas para picar son 28°C y una alta humedad relativa, superior al 70% (Christophers, 1947 En: Christophers, 1960).

La dispersión del mosquito en su fase adulta es pasiva y está dada por su capacidad de vuelo, el que realiza cuando la brisa es leve; debido a sus hábitos domésticos no necesita desplazarse a grandes distancias.

Posee un rango de vuelo corto (25-50 metros), y raramente se mueve a largas distancias; sin embargo si la hembra no encuentra sitios de oviposición adecuados es capaz de desplazarse hasta tres kilómetros de distancia, los machos se desplazan menos que las hembras (Nelson,

1986). Otra función de esta dispersión, puede ser la búsqueda de carbohidratos suplidos por las flores y frutas que se encuentran en el exterior de la vivienda (Trips, 1986).

2.3.5 APAREAMIENTO

Una característica de *Ae.aegypti* es el mayor número de machos con respecto a las hembras (Christophers, 1960).

La cópula se puede dar dentro de las primeras 24 horas después de la emergencia, el mínimo de tiempo necesario que el macho requiere para la rotación de la genitalia externa (Horsfall, 1955). Normalmente se inicia durante el vuelo, algunas veces ocurre en superficies verticales y raramente, en superficies horizontales (Clements, 1963).

El macho es atraído hacia la hembra mediante el sonido producido por las alas durante el vuelo. La cópula se puede dar mientras la hembra se alimenta, debido a que el macho también es atraído por el hospedero vertebrado, lo cual facilita el apareamiento. Una sola inseminación es suficiente para fertilizar todos los huevos que la hembra produce durante su tiempo de vida (Nelson, 1986).

Después de una ingesta de sangre, es poco probable que ocurra apareamiento ya que el movimiento de las alas

es mayor por el incremento en el peso. Este aumento en la velocidad de movimiento de las alas no es atractivo para el macho (Horsfall, 1955; Nelson, 1986).

2.3.6 OVIPOSICION

La selección de los sitios para la oviposición pueden estar influenciados por la intensidad de luz, el reflejo de la superficie del agua y la textura de la superficie. También gran cantidad de compuestos orgánicos producen una respuesta positiva para la oviposición. Las bacterias son nutrientes importantes para las larvas de *Ae.aegypti*; tanto las bacterias como los metabolitos bacterianos influyen en la selección de éstos sitios (Roberts, 1977).

La cantidad de luz parece ser el principal factor regulador de la oviposición. Haddow y Gillet en 1957, verificaron que en las condiciones normales de variación luminosa del día, el mosquito presenta ciclos regulares de oviposición, ocurriendo la mayor parte en la tarde (Haddow y Gillet EN: Forattini, 1965).

En Africa se reconocen tres tipos de sitios diferentes de oviposición de acuerdo al habitat del adulto. El doméstico incluye criaderos hechos por el hombre, tales como barriles, tinas y varios utensilios domésticos usados para el almacenamiento de agua, que son

protegidos de la lluvia por el hombre. El peridoméstico consiste de criaderos que se encuentran alrededor del domicilio humano incluyendo jardines, y que son hechos por el hombre, tales como latas, llantas, barriles, o que son naturales como huecos de árboles, y cáscaras de cocos. El selvático incluye primariamente huecos de árboles, axilas de las hojas, y ocasionalmente oquedades en las rocas, los cuales estan expuestos a las lluvias (Trips, 1975).

2.3.7 LONGEVIDAD

La longevidad de los mosquitos varía de acuerdo a la humedad, temperatura, tipo de alimento y frecuencia de alimentación. En condiciones naturales el *Ae.aegypti* vive unas dos o tres semanas, pero en condiciones de laboratorio puede vivir de tres a cuatro meses (Christophers,1960.;Nelson,1986).

2.3.8 PAPEL COMO VECTOR

El conocimiento de los patrones de dispersión del mosquito es de suma importancia en el entendimiento de la epidemiología y ecología de las enfermedades transmitidas por vectores (Trips, 1986).

En la actualidad el *Ae.aegypti* está sujeto a considerable atención por los entomólogos médicos y trabajadores en Salud Pública. La importancia de ésta especie es el papel que juega como vector de la fiebre amarilla urbana en Africa, y como vector primario de dengue en el mundo tropical (Craig, 1967).

Los factores que afectan la capacidad del vector para transmitir enfermedades son las siguientes: susceptibilidad al patógeno, antropofilia/zoofilia, período de incubación extrínseco, cantidad de inóculo del patógeno, dispersión del vector, tamaño de la población del vector, longevidad, frecuencia de picadura dentro de un ciclo gonotrófico y fecundidad (Trips, 1986).

En la naturaleza se reconocen tres huéspedes naturales para el virus de dengue: humanos, primates y mosquitos del género *Aedes*. Los humanos son los únicos hospederos que pueden desarrollar sintomatología clínica por infección con virus dengue. El cuadro causado por infección con el virus dengue puede variar desde subclínico hasta muy severo con hemorragia o shock, y muerte (Gubler, 1988).

En la naturaleza el virus de dengue presenta tres ciclos básicos de transmisión: 1. Ciclo doméstico o urbano que involucra humanos y especies domésticas de *Aedes*. 2. Ciclo peridoméstico o rural que involucra humanos y

especies peridomésticas de *Aedes*. 3. Ciclo selvático que involucra primates pequeños y especies de *Aedes* selváticos (Gubler, 1988).

Después de un período de incubación de cuatro a seis días (mínimo tres, máximo diez), el virus circula en la sangre de pacientes durante la fase aguda de la enfermedad (WHO, 1986), constituyendo la principal y quizás la única fuente de infección para el mosquito. Este, una vez infectado, permanece así el resto de su vida (Rosen et al, 1983).

Un factor importante que hace al *Ae.aegypti* un vector eficiente del virus de dengue es su hábito de tomar cantidades parciales de sangre o alimentación interrumpida. Por esta razón un solo mosquito infectado puede transmitir dengue a dos personas o más, en un período corto de tiempo (Gubler, 1988). Después de ingerir sangre de una persona con virus circulante, la hembra de *Ae.aegypti* puede transmitir dengue inmediatamente, por el cambio de hospedero cuando la ingestión de sangre es interrumpida (transmisión mecánica), o después del período de incubación extrínseco (transmisión biológica) (WHO, 1986).

El período de incubación extrínseco en el mosquito toma de ocho a diez días, durante el cual el virus se replica en los tejidos del mosquito hasta llegar a niveles

altos en las glándulas salivales del mismo (Halstead, 1984).

El movimiento del virus a través del vector para que luego pueda ser transmitido después de una ingesta de sangre es el siguiente:

- ingestión de sangre con virus circulante.
- infección y multiplicación en células epiteliales del mesenterio.
- liberación del virus de las células epiteliales:
- El virus infecta las glándulas salivales y secundariamente se multiplica en otras células/tejido o infecta las glándulas salivales sin multiplicación secundaria en otras células/tejidos.
- Liberación del virus de las glándulas salivales y las células epiteliales y transmisión por picadura (Monath, 1988).

El término competencia vectorial ha sido muy usado y denota en parte la habilidad de los artrópodos hematófagos de infectarse con un virus después de la ingestión de sangre con virus circulante, y subsecuentemente de transmitirlo cuando se alimenta de un huésped vertebrado (Monath, 1988).

Los ciclos de transmisión de los arbovirus son dependientes de la interrelación que existe entre el

virus, vector y el hospedero vertebrado, los cuales están influenciados por las condiciones del medio ambiente.

La competencia del vector está afectada por factores intrínsecos y extrínsecos. Entre los factores extrínsecos están la densidad y composición del mosquito, la población de vertebrados y condiciones ambientales. Los factores intrínsecos están influenciados por la preferencia de hospedero por parte del mosquito y la habilidad del mosquito de infectarse con virus después de la ingestión con sangre infectada sostener la replicación viral, y la subsecuente habilidad del mosquito de transmitirlo por picada o a través de transmisión transovárica (Hardy et al, 1983).

La cantidad de virus requerido para infectar una proporción significativa de la población del vector es un factor cuantitativamente importante que afecta la competencia vectorial (Gubler, 1979).

Estudios experimentales sobre la competencia del vector a varios arbovirus han demostrado que la duración del período de incubación extrínseco es influenciado marcadamente por la temperatura del medio ambiente. (Watts et al, 1987).

Las variaciones intraespecíficas en la competencia del vector se han atribuido a la heterogeneidad genética de la población vectora de mosquitos; sin embargo, éstos

mecanismos aún no han sido aclarados en su totalidad (Mitchell, 1983).

2.4 DENGUE

El dengue se ha conocido clínicamente por más de 200 años, pero la etiología de la enfermedad no fue descubierta hasta 1944. David Baylon hizo la primera descripción de ésta enfermedad epidémica a la que llamó "fiebre articular"; la estudió en Batavia Java, en el año 1779. Durante el siglo XIX se hicieron muchas comunicaciones de epidemias en zonas tropicales y subtropicales de todo el mundo y se aceptó el nombre general de "dengue" en 1869 por el "Royal College of Physicians", en Londres (Rivers y Horsfall, 1965).

Los primeros informes realizados acerca de la transmisión del virus dengue por mosquitos fueron hechos por Graham en 1903 (Gubler, 1988). Bancroft en 1906 publicó la primera prueba de que el mosquito *Ae.aegypti* era el vector de la enfermedad (Rivers y Horsfall, 1965).

Ashburn y Craig (1907) fueron los primeros en demostrar experimentalmente la presencia de virus en sangre circulante; también dieron la primera prueba de que el agente etiológico era filtrable (Siler et al, 1926) .

La enfermedad dengue es producida por el virus dengue, un arbovirus que pertenece a la familia *Flaviviridae*, género *Flavivirus* (Karabatsos, 1988). Este microorganismo mide de 43 a 48 nanómetros (nm) de diámetro, está rodeado de una capa proteica y una envoltura lipídica. Se replica en el citoplasma y las partículas virales maduran adquiriendo una cubierta lipídica en vesículas del retículo endoplásmico o en la membrana citoplasmática; previamente dichas membranas son modificadas por la inserción de glicoproteínas codificadas por el virus (Figueroa, 1983).

Se reconocen cuatro serotipos distintos de dengue. Durante la Segunda Guerra Mundial, Sabin diferenció los serotipos uno y dos; años después en Filipinas, Hammon y colaboradores reconocieron los serotipos tres y cuatro. Dichos serotipos confieren inmunidad cruzada (heteróloga) de corta duración de manera que teóricamente es posible padecer dengue varias veces, cada vez con un serotipo diferente. La inmunidad homóloga es de larga duración, dependiendo esto la circulación de los diferentes serotipos en determinadas áreas geográficas (Figueroa, 1983.; Halstead, 1984).

En 1954, en Manila, Filipinas se reconoció por primera vez una nueva enfermedad también ocasionada por el virus dengue, esta vez con manifestaciones hemorrágicas,

shock y alta mortalidad en niños. Esta fue la fiebre hemorrágica de dengue/síndrome de shock por dengue (FHD/SSD), la cual se puede definir como un síndrome de permeabilidad vascular aguda acompañado por la activación de la coagulación sanguínea y sistema de complemento (Halstead, 1980)

Esta enfermedad llegó a Bangkok, Tailandia en 1958 y diez años después se extendió a Malasia, Singapur, Burma, Indonesia y Sri Lanka. Durante el período 1975-78 en Burma se presentaron 17,251 hospitalizaciones con 772 muertes; en Indonesia 21,818 hospitalizaciones con 916 muertes, y en Tailandia 71,312 hospitalizaciones con 1,676 muertes (WHO, 1986).

En 1977, después de 30 años de ausencia, el virus dengue fue reintroducido en Cuba. Estudios serológicos indicaron que aproximadamente el 45% de la población cubana fué infectada con virus dengue-1 en el período 1977-80. En 1981 circuló el virus dengue-2 y se reportaron alrededor de 350,000 casos de dengue clásico y DHF. Se hospitalizaron 116,143 personas, hubo 24,000 casos de DHF, 10,000 casos de DSS con 158 muertes. El Gobierno Cubano actuó con rapidez y como resultado de ello pudo evitar que ocurrieran más muertes, (Halstead, 1984; WHO, 1986).

La etiología del síndrome de la FHD/DSS no es bien conocida; se sugiere que es debida a una respuesta

inmunológica dada por infecciones sucesivas de los diferentes serotipos de dengue. Se han sugerido varias hipótesis para tratar de explicar éste síndrome:

Una de las hipótesis propone la activación de un sistema de hipersensibilidad retardada, en donde hay una activación o sensibilización de los linfocitos T (L-T) durante una infección secundaria por el antígeno viral presente en la superficie de los fagocitos mononucleares.

Las células T activadas por el antígeno, liberan una variedad de mediadores químicos biológicamente activos, llamados linfoquinas, éstas pueden tener efecto sobre la permeabilidad vascular, sistema de complemento y sistema de coagulación sanguínea, lo que llevaría a shock y hemorragia (Pang, 1983).

Halstead propone que la respuesta inmunológica probablemente es mediada por L-T; los monocitos infectados con virus dengue son activados y liberan una variedad de factores (factor de la permeabilidad vascular, factores activadores de complemento y tromboplastina), los cuales producen shock y hemorragia. El número de células infectadas es un factor crítico en la inmunopatogénesis de DHF/DSS (Halstead, 1980-81).

Russell sugiere que los complejos entre el antígeno viral y la inmunoglobulina IgG anti-dengue interactúan con el sistema de complemento, generando anafilotoxinas,

degranulación de células y liberación de histamina, causando permeabilidad vascular aguda (Pang, 1983).

Rosen, propone otra hipótesis para explicar el incremento en la incidencia de manifestaciones clínicas severas en Asia. Cepas de *Ae.aegypti* resistentes a la infección con virus dengue, necesitan altas viremias para infectarse, por lo tanto ocasionarían manifestaciones clínicas severas, en los humanos. Por otra parte, si el vector es susceptible de infectarse, es capaz de transmitir cepas virales que producen bajas viremias y el porcentaje de infección con altas viremias es bajo, consecuentemente la severidad de la enfermedad es menor (Rosen et al, 1985).

El hallazgo mas común en la epidemiología de DHF/DSS, es que éste síndrome usualmente ocurre en personas con anticuerpos (Ac) de dengue por una infección previa, adquiridos pasiva o activamente. Estudios patológicos y patogénicos de la infección en el hombre; demuestran que el virus posee una marcada predilección por el tejido linfoide; se ha encontrado en macrófagos, histiocitos y células de Kupffer. En hallazgos recientes el virus se ha aislado de leucocitos en sangre periférica durante la fase aguda de FHD/DSS (Halstead, 1980).

Ninguna de estas teorías ha sido demostrada totalmente; los autores sugieren que aún es necesario

llevar a cabo estudios mas a fondo para poder explicar el síndrome FHD/DSS.

Recientes estudios mostraron que infantes menores de un año con DHF/DSS, al nacer tenían Ac maternos hacia dengue, muchas de esas madres mostraron Ac a mas de un serotipo de dengue, indicando dos o más infecciones previas (Halstead, 1981). Los Ac maternos juegan un doble papel durante la infancia, en los primeros meses de vida esos Ac son transferidos pasivamente, los que confieren protección al infante. Después de unos meses esos Ac van disminuyendo progresivamente hasta alcanzar niveles no protectivos, sin embargo en una nueva infección con otro serotipo de virus dengue se asume que esos Ac son los que presentan un riesgo específico para convertir una infección primaria en DHF/DSS (Kliks et al, 1988).

Se ha observado que una buena nutrición posee un efecto negativo sobre el resultado de DHF/DSS. Es raro observar este síndrome en niños con una nutrición proteico-calórica deficiente; es una enfermedad de clase media y alta (Halstead, 1981).

La respuesta inmune está bajo control genético y nutricional, se considera a la mujer inmunologicamente más competente que el hombre; los individuos bien nutridos son inmunologicamente más competentes que los mal nutridos. Se ha visto que FHD/DSS es más frecuente en mujeres que en

hombres, y en personas bien nutridas que en mal nutridas
(Halstead, 1980).

3. SEGURIDAD EN EL LABORATORIO

Como requisito para iniciar el estudio de susceptibilidad del *Ae.aegypti* al virus dengue-1, se sometió el proyecto de estudio para su aprobación, al Comité Interno del Laboratorio Conmemorativo Gorgas con la presencia de asesores de la Organización Panamericana de la Salud (OPS) y miembros del Servicio Nacional de Erradicación de la Malaria (SNEM). Con esta aprobación inicial se sometió a la aceptación por parte del Ministerio de Salud.

La División de Virología del Laboratorio Gorgas cuenta con todas las medidas de seguridad requeridas para este tipo de estudio. Es clase III, con sistemas de presiones negativas entre pasillo y laboratorio y entre laboratorio e insectario.

Los laboratorios y el insectario tienen instalado un sistema de filtros Hepa. El insectario reúne las condiciones de bioseguridad para trabajar con mosquitos infectados. Las ventanas se encuentran selladas y cubiertas por una fina malla metálica. La comunicación entre el insectario y el laboratorio tiene un sistema de puertas dobles con presión negativa, de tal manera que no se puede abrir una puerta sin haber cerrado la otra. Como una medida de seguridad adicional entre estas dos puertas

se encuentra una cortina de gasa doble, con un contrapeso en la parte inferior, para que no pierda su posición. Sobre la puerta de entrada al insectario existe una cortina de aire la cual se activa al momento de abrir la puerta.

Dentro del insectario, existe un cubículo pequeño cerrado por una malla metálica fina con puerta corrediza, a la vez protegida por una cortina de gasa doble.

En el campo las larvas colectadas fueron depositadas en recipientes plásticos con tapa de rosca y colocadas en neveras con tapa hermética.

Una vez que las muestras ingresaron al insectario, fueron manejadas con sumo cuidado. Tanto las larvas, pupas y adultos fueron mantenidos en cámaras con doble puerta, temperatura y humedad controladas y ciclos de luz-oscuridad de 12 horas.

La manipulación de los mosquitos adultos se efectuó dentro de el cubículo ya descrito. Al ser infectados los mosquitos, el acceso al insectario fue totalmente restringido; solo tres personas tuvimos entrada al área.

Las ampolletas conteniendo el virus se abrieron y el virus se diluyó dentro de la cámara de flujo laminar y durante las inoculaciones se extremaron las medidas de seguridad. Se utilizaron guantes y tapabocas desechables.

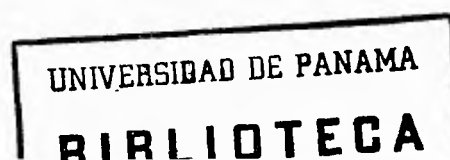
El ratón que se utilizó en cada una de las infecciones de mosquitos con virus dengue-1 fue manipulado cuidadosamente; fué anestesiado para evitar movimientos bruscos y así prevenir cualquier accidente de laboratorio por jeringas contaminadas, e infectado con virus dengue-1 dentro del cubículo descrito anteriormente.

Al terminar de infectar los mosquitos, la jaula fué retirada de la cámara a 28 °C y llevada al cubículo interior protegido con la malla de metal, el ratón fue retirado con cuidado de que ningún mosquito escapara de la jaula, se le sacrificó, se colocó en una bolsa plástica sellada y se incineró.

Para determinar los mosquitos que chuparon sangre, se anestesiaron y se transfirieron rapidamente a jaulas limpias. Las jaulas se decontaminaron con luz ultravioleta y se lavaron con desinfectante 24 horas después.

La maceración de cabezas en las laminillas para fluorescencia, al igual que las inoculaciones de las suspensiones de los mosquitos infectados en los cultivos celulares, se llevó a cabo en la cámara de flujo laminar vertical, utilizando material estéril, guantes y tapaboca.

Todo el material utilizado fue descartado en envases metálicos cubiertos, para su esterilización en la autoclave, que se encuentra en el mismo piso en donde está



ubicado el laboratorio, de manera que ningún material contaminado salió de ésta sección.

16 semanas después de finalizado el estudio, se me tomó una muestra de sangre y el suero se analizó para determinar la presencia de Ac de dengue utilizando las técnicas de inhibición de la hemaglutinación y neutralización, con resultados negativos.

4. MATERIALES Y METODOS

4.1 MOSQUITOS

4.1.1 COLECTA

Se colectaron larvas de tercer y cuarto estadio de *Ae.aegypti* en siete corregimientos del Area Metropolitana de la ciudad de Panamá: Amelia Denis de Icaza al norte, Río Abajo y Pueblo nuevo al noreste, San Francisco y Parque Lefevre al sureste, Bella Vista y Calidonia al suroeste. (Mapa 1)

La localización de focos de *Ae.aegypti* fué realizada por funcionarios del Servicio Nacional de Erradicación de la Malaria (SNEM). Una vez localizado el criadero, procedimos a colectar las larvas utilizando goteros de vidrio de una onza. La mayoría de las larvas fueron colectadas de llantas y chatarra en talleres mecánicos y de plantas acuáticas en las viviendas. Las larvas fueron colocadas en envases plásticos de medio galón con tapa de rosca. Cada envase representó la muestra de un sitio diferente. Se rotuló con el número de registro correspondiente y a la vez se llenó un formulario con los datos respectivos de la muestra (Anexo 1).

Estos envases fueron colocados en neveras portátiles con tapa hermética y transportados a la unidad de Virología del Laboratorio Conmemorativo Gorgas, acondicionado para este tipo de estudios (Cap.3).

En el laboratorio el contenido de cada envase fué vertido en una bandeja blanca esmaltada de 30x18x3 cm. Se procedió a separar las muestras de los desechos, tales como hojas, tierra, etc, ya que al coleccionar la muestra, ésta se tomaba en las mismas condiciones en que se encontraba. Las larvas se transferían a otras bandejas con agua limpia, que se había tomado del grifo 24 horas antes y dejado en reposo sin tapa para eliminar los gases de cloro. Se utilizaron goteros plásticos, a los cuales se les cortó la punta con el fin de no dañar las larvas, se transferían entre una y diez larvas cada vez hasta pasarlas en su totalidad. La muestra original se mantuvo durante ocho días, revisándola diariamente, por la mañana y por la tarde, ya que existían huevos que no habían eclosionado al momento de la colecta o larvas en primer estadio, que por su tamaño eran difíciles de coleccionar. Transcurrido éste tiempo de observación, se procedió a descontaminar la muestra restante en un envase metálico que permitía la esterilización en la autoclave.

En cada bandeja se colocaron no más de 200 larvas, para

evitar sobrepoblación y permitir un crecimiento óptimo (Gerber, 1970).

Las bandejas fueron rotuladas de acuerdo al número de registro de la muestra y revisadas dos veces al día.

Las bandejas fueron colocadas en incubadoras con doble puerta, especiales para mosquitos, a una temperatura de 28°C, humedad relativa de 80% y ciclos de luz-oscuridad de 12 horas.

4.1.2. Mantenimiento en el insectario

La alimentación de las larvas consistió en purina granulada, que se preparó de la siguiente manera:

Se colocaron de diez a doce tabletas de purina en un vaso químico con agua caliente que se cambió repetidas veces, con el fin de eliminar el contenido de grasa. Finalmente se adicionó agua de manera que cubriera totalmente la purina, se dejó en reposo durante 24 horas hasta que tomara una consistencia granular y se almacenó a 4°C.

A una bandeja conteniendo 1,000 ml de agua se adicionó 0.5 ml de alimento diariamente ya que las larvas de *Ae.aegypti* son voraces. A medida que las larvas pasaban al estado de pupa se separaban, una por una, de las larvas restantes, utilizando goteros de boca ancha

para evitar dañarlas. Las pupas se pasaban a envases plásticos de dos onzas con agua limpia libre de cloro, se identificaban con el número de registro y fecha, se colocaban dentro de jaulas de mosquitos. Las jaulas de mosquitos fueron confeccionadas con envases cilíndricos de cartón de dos galones, con la parte superior cubierta por un tul y una abertura lateral a la que se le añadió una manga que permite la manipulación de los mosquitos.

Las jaulas se colocaron en las incubadoras con la temperatura, humedad y ciclos de luz-oscuridad descritos.

Los adultos emergían entre las 36 y 48 horas; de inmediato se les proporcionaba alimento consistente en miel de abeja y agua, colocados en algodones sobre el tul.

4.2 VIRUS

La cepa de virus de dengue-1 utilizada en este estudio fué obtenida de un aislamiento humano, procedente de Jamaica en 1977 con un pasaje en cultivos de células de pulmón de mono Rhesus, cinco pasajes en células de riñón de mono verde (Vero), tres pasajes en *Haemagogus*, y dos pasajes en *Toxorhynchites*. El título obtenido de esta cepa fué de 5.6 dex.

Un mosquito ingiere más o menos 3 μ l de sangre cuando chupa hasta llenarse totalmente. El virus se diluyó en

PBS-gelatina 0.5% (PBS-gel) de manera que se obtuvieran 1,000, 100 y 10 partículas virales (pv) por cada 3 µl de sangre de ratón, teniendo en cuenta el título de 5.6 dex de la cepa utilizada y que un ratón tiene aproximadamente 2.5 ml de sangre.

PBS-gelatina pH 7.2

NaCL	80.00 gr
KCL	2.00 gr
Na ₂ HPO ₄	10.7812 gr
KH ₂ PO ₄	2.50 gr
MgCl ₂ .6H ₂ O	1.34 gr
Gelatina 5%	1,000 ml
Agua destilada	10,000 ml

Se distribuyen 100 ml por botella.

4.3 INFECCION DE LOS MOSQUITOS CON EL VIRUS DEN-1

La técnica utilizada para infectar a los *Ae.aegypti* ha sido desarrollada en nuestro laboratorio, utilizando ratones blancos de laboratorio. Esta técnica produce una viremia transitoria en el ratón, que dura aproximadamente cinco horas.

La metodología desarrollada es la siguiente:

-los mosquitos seleccionados para ser infectados fueron desprovistos de alimento desde el día anterior, ya que al tener el estómago vacío la ingesta es abundante;

-se utilizaron ratones blancos machos de ocho semanas de nacidos, porque las venas de la cola están bien desarrolladas;

-cada ratón fué anestesiado con Nembutal sódico, 0.1 ml subcutáneo utilizando jeringuillas de 0.5 ml y aguja de 27g 1;

-se le dejó en reposo durante diez minutos esperando el efecto del anestésico;

-se sujetó el ratón sobre una tabla con tornillos en sus esquinas, a los que se ataron cada una de las patas y se expuso en posición ventral;

-se introdujo la cola del ratón en agua a 40°C para que las venas se dilataran;

-utilizando una jeringuilla se inyectó 0.1 ml de la dilución del virus correspondiente, en una de las tres venas visibles de la cola, preferiblemente a mitad de la cola;

-transcurridos 15 minutos se procedió a tomar 50 µl de sangre del ojo del ratón para confirmar la circulación del virus en la sangre. Se colocó la cabeza del ratón de lado, presionando un poco con los

dedos para inmovilizarlo, tomando un capilar para hematocrito entre los dedos se giró y a la vez presionó suavemente cerca del pliegue del ojo hasta que la membrana cedió, instantáneamente la sangre ascendió por capilaridad;

-la sangre obtenida del ojo del ratón se diluyó 1:3 con solución PBS-gelatina. Se inoculó en tubos con cultivo celular de *Toxorhynchites amboinensis* (TRA-284); éstos fueron observados diariamente. A los diez días se cosecharon las células de los tubos en forma individual y se realizó la prueba de fluorescencia indirecta. La técnica en detalle será escrita más adelante;

-después de 15 minutos de inoculado en la vena de la cola, el ratón fué introducido en la jaula con mosquitos machos y hembras durante 45 minutos. Los *Ae.aegypti* machos y hembras permanecieron juntos dentro de la jaula hasta el final de la ingesta. Al cabo de éste tiempo el ratón se sacó de la jaula, se sacrificó y se incineró;

-los mosquitos fueron anestesiados con ayuda de CO₂ y examinados individualmente con ayuda del estereoscopio.

-las hembras que no ingirieron sangre, o que lo hicieron en forma parcial fueron eliminadas junto con

los machos colocándolos en pequeñas cajas y congelándolos a -85°C durante 24 horas, para después ser depositados en recipientes con desinfectante (Wescodyne 10%). Finalmente se decontaminaron en la autoclave. Las jaulas en donde se efectuó la infección de los mosquitos fueron decontaminadas con luz ultravioleta por 24 horas y lavadas con Wescodyne para ser reutilizadas;

-las hembras que llenaron completamente su estómago siguieron en el experimento, se colocaron en jaulas limpias. Las jaulas se colocaron dentro de las cámaras del insectario, siendo observadas diariamente.

Transcurridos siete días post-infección se colectó el 50% de las hembras, se congelaron a -85°C en viales "Nunc" de 1.8 ml con tapa de rosca, debidamente rotulados con el respectivo número de muestra. Las otras hembras se mantuvieron vivas hasta el día 12, cuando fueron colocadas y congeladas en viales rotulados.

Después de ingerir sangre, las hembras que murieron entre el primer y sexto día, octavo y décimo primer día fueron colectadas, congeladas y examinadas posteriormente.

Los cultivos celulares fueron proporcionados por la Lic. Gladys Oro, Laboratorio de Cultivo de Tejidos. Laboratorio Conmemorativo Gorgas.

4.4 DETECCION DEL VIRUS DE DENGUE EN *Ae.aegypti*

La detección de dengue en los mosquitos se realizó utilizando la cabeza del mosquito, y probándola con técnicas de inmunofluorescencia indirecta. Los mosquitos en cuyas cabezas no se detectó el virus no se consideraron negativos hasta examinarles el tórax y el abdomen, que se sonificaron e inocularon en cultivos celulares.

Las laminillas de vidrio utilizadas para la fluorescencia indirecta tenían diez círculos, en cada uno se probaron, un control negativo, positivo y ocho cabezas de mosquitos. Los controles negativos y positivos se prepararon de la siguiente manera:

4.4.1 PREPARACION DE CONTROLES PARA INMUNOFLUORESCENCIA

Control Positivo

Para la preparación del control positivo, en la cámara de flujo laminar se procedió a inocular 0.1 ml de virus de dengue-1 en dos tubos de cultivo celular TRA-284. Se observaron diariamente para detectar efecto citopático. A los diez días se cosecharon las células para preparar los controles positivos. Cada tubo se agitó fuertemente para desprender las células de la pared de éste, y se

centrifugó a 1,500 revoluciones por minuto (rpm) durante 15 minutos a 5°C. El sobrenadante fue descartado depositándolo en un vaso químico y colocando éste en un recipiente de metal que fue llevado a la autoclave posteriormente.

El sedimento se mezcló con el líquido restante y con pipeta Pasteur se depositó gota a gota en los pocillos de la laminilla señalados como controles positivos para la prueba de fluorescencia.

Los tubos utilizados fueron descartados en un envase metálico para su posterior decontaminación en la autoclave.

Control Negativo

Se tomaron 125 hembras que fueron alimentadas con sangre de ratones de laboratorio sin virus de dengue, mantenidas bajo condiciones similares a las infectadas y finalmente congeladas a -85°C hasta el momento de preparar las laminillas para la fluorescencia. El resto de los cuerpos de los mosquitos fue descartado en Wescodyne y esterilizado posteriormente.

4.4.2 Preparación de las muestras de cabezas para inmunofluorescencia

En la cámara de flujo laminar vertical, se tomó cada mosquito en forma individual, se separó la cabeza del resto del cuerpo con ayuda de un bisturí y pinzas, las cabezas se fueron colocando una a una en la laminilla.

Se colocó un cubreobjetos de 24x50 mm. No.1, con el borrador de un lápiz se presionó cada cabeza de manera que el tejido quedara bien distribuido en cada uno de los pocillos. Las lamimillas se fijaron en acetona fría durante 24 horas a -85°C. Si las placas no se utilizaban de inmediato se mantenían en acetona a -85°C hasta el momento de realizar la prueba.

El tórax y el abdomen de los mosquitos a prueba fueron colocados en viales rotulados y colocados a -85°C, para análisis posterior si el resultado obtenido fuese negativo.

4.4.3 Inoculación de suspensiones de tórax y abdomen de *Ae.aegypti* en cultivos de células de mosquito

El método utilizado para la demostración de presencia de virus de dengue en los mosquitos cuyo resultado en la fluorescencia de cabezas dió negativo, consistió en la

inoculación del tórax y abdomen sonificado, en cultivos celulares:

- todo el procedimiento se realizó dentro de la cámara de flujo laminar. Los tubos plásticos de 12 ml colocados en raquetas de metal se mantuvieron en un baño de hielo a 4°C;
- con pipeta automática estéril se agregó a cada tubo 0.5 ml de diluyente para suspensiones de mosquito (volúmenes iguales de amortiguador Sorensen's y estabilizador de sucrosa-gelatina;
- se tomó el cuerpo del mosquito y se colocó en el tubo etiquetado con el número del mosquito;
- los mosquitos se sonificaron en forma individual utilizando un Sonifier cell disruptor, modelo W185D. Los tubos fueron mantenidos a 4°C durante todo el procesamiento. Después de sonificar cada mosquito el sonificador fue desinfectado con alcohol de 70°;
- los tubos se centrifugaron a 10,000 rpm/30min a 5°C;
- el sobrenadante fué depositado en viales "Nunc", se tomó 0.2 ml, se inoculó 0,1 ml en dos tubos de cultivo celular de mosquito TRA-284, y el resto se guardó a -85°C;
- antes de la utilización de los tubos de cultivo celular se reemplazó el medio de crecimiento por medio de mantenimiento. Se decantó el medio de

crecimiento en un vaso químico y con la pipeta estéril automática Cornwall se depositó en cada tubo 1.5 ml de medio de mantenimiento;

-los tubos inoculados fueron colocados a 28 °C y observados diariamente por la presencia de efecto citopático durante diez días.

-transcurridos los diez días se desprendieron las células de la pared de los tubos con agitación fuerte, éstos se centrifugaron a 1,500 rpm/15min, 5°C;

-el sobrenadante fué colocado en viales "Nunc" y guardados a -85°C;

-el paquete celular con el fluido restante se tomó con pipeta Pasteur y una pequeña cantidad de células fué colocada en uno de los pocillos de la laminilla para fluorescencia.

Este procedimiento se repitió con cada una de las suspensiones de células TRA-284, se colocaron ocho suspensiones desconocidas, el control positivo y el negativo por laminilla.

Las laminillas se dejaron secar a temperatura ambiente, para ser fijadas en acetona a -85°C, hasta realizar la fluorescencia.

Todo el material utilizado en este procedimiento fué descartado y decontaminado en la autoclave.

Medio para preparar suspensiones de mosquitos

Sorensen's	100.00 ml
Medio estabilizador	100.00 ml
Estreptomicina ($10^2 \mu/\text{ml}$)	1.60 ml
Penicilina ($10^5 \mu/\text{ml}$)	1.0 ml
Anfotericina	1.0 ml

Sorensen's

Na_2HPO_4	8.33 gr
KH_2PO_4	1.09 gr
Agua destilada	1,000.00 ml
Ajustar pH a 7.65.	

Medio estabilizador

KOH	2.74 gr
L-ácido glutámico	7.20 gr
K_2HPO_4	12.54 gr
KH_2PO_4	5.40 gr
Sucrosa	750.00 gr
Gelatina 20%	1,000.00 ml
Agua destilada	5,000.00 ml
Ajustar a pH 8.	

Medio de Mantenimiento de células TRA-284

Leibovitz (L 15) (Gifco)	100 ml
Caldo de triptofosfato (Difco)	100 ml
Glutamina	2 ml
Penicilina, Espstreptomicina	2 ml
Anfotericina	1 ml

Caldo Triptosa Fosfato (TPO₄)

TPO ₄	29.50 gr
Agua destilada	1,000.00 ml

4.4.4 Inmunofluorescencia Indirecta

- Después de haber sido fijadas en acetona por 24 horas las laminillas se sacaron del congelador y se secaron a temperatura ambiente;
- se lavaron con agitación suave en un rotador mecánico durante dos minutos con PBS pH 7.6 y con agua destilada durante dos minutos más;
- las laminillas se secaron con un secador eléctrico durante unos minutos;
- se agregó 10 µl de anticuerpos monoclonales diluidos 1:10 en PBS pH 7.4 en cada pocillo. (Dengue Strain H241, Monoclonal Antibody D3-5C9-1 in mouse ascitic fluid. Lot.1. CDC, San Juan, Puerto Rico);

-se incubó en cámara húmeda a 34°C durante 30 minutos;

-en agitación suave, con PBS se lavaron las laminillas durante ocho minutos, y dos minutos más con agua destilada;

-las laminillas fueron secadas;

-se agregó fluoresceína conjugada previamente titulada, en una dilución 1:40 de Azul de Evans.

(Fluorescein conjugated affinity. Purified Goat Antimouse. IgG. Heavy & Light chains specific. 30361. Cat. #1611-0091. Cappel);

-se incubó en cámara húmeda a 34°C durante 30 minutos;

-se lavó con PBS, en agitación suave durante ocho minutos y dos minutos más con agua destilada;

-las laminillas fueron secadas;

-se colocó una gota de glicerina/PBS pH 9.0 en cada uno de los pocillos y se cubrió con un cubreobjetos de 24x50 mm No.1;

-la lectura se realizó en un microscopio de fluorescencia, modelo Leitz de luz incidente, con lámpara de mercurio.

PBS Solución Salina Fosfatada pH 7.6, 0.01 M

Solución Concentrada (10X)

Na₂HPO₄-anhidro 12.36 gr
NaH₂PO₄.H₂O 1.80 gr
NaCL 85.00 gr
Agua destilada 1,000 ml

PBS Solución de Trabajo pH 7.6, 0.01 M

Solución concentrada (10 X) 100 ml
Agua destilada 1,000 ml

Se debe verificar el pH y ajustar si es necesario.

Azul de Evans (Sigma)

Solución al 1%, mezclar:

Azul de Evans 0.5 gr
PBS, pH 7.6 50 ml

Titulación del conjugado

En una laminilla, previamente preparada con cultivos celulares positivos para Dengue-1, se colocaron anticuerpos monoclonales diluidos 1:10 (de acuerdo a las instrucciones del CDC) en cada uno de los pocillos, seguida de la respectiva incubación, lavado y secado de la laminilla. Se utilizaron diluciones dobles del conjugado en Azul de Evans partiendo de 1:10 hasta 1:320.

Siguiendo los pasos de la técnica para fluorescencia descrita anteriormente, la laminilla fué examinada al microscopio de fluorescencia, y se escogió la dilución óptima o sea la dilución en donde las fluorescencia se observó más nítida.

Glicerina fosfatada pH 9.0

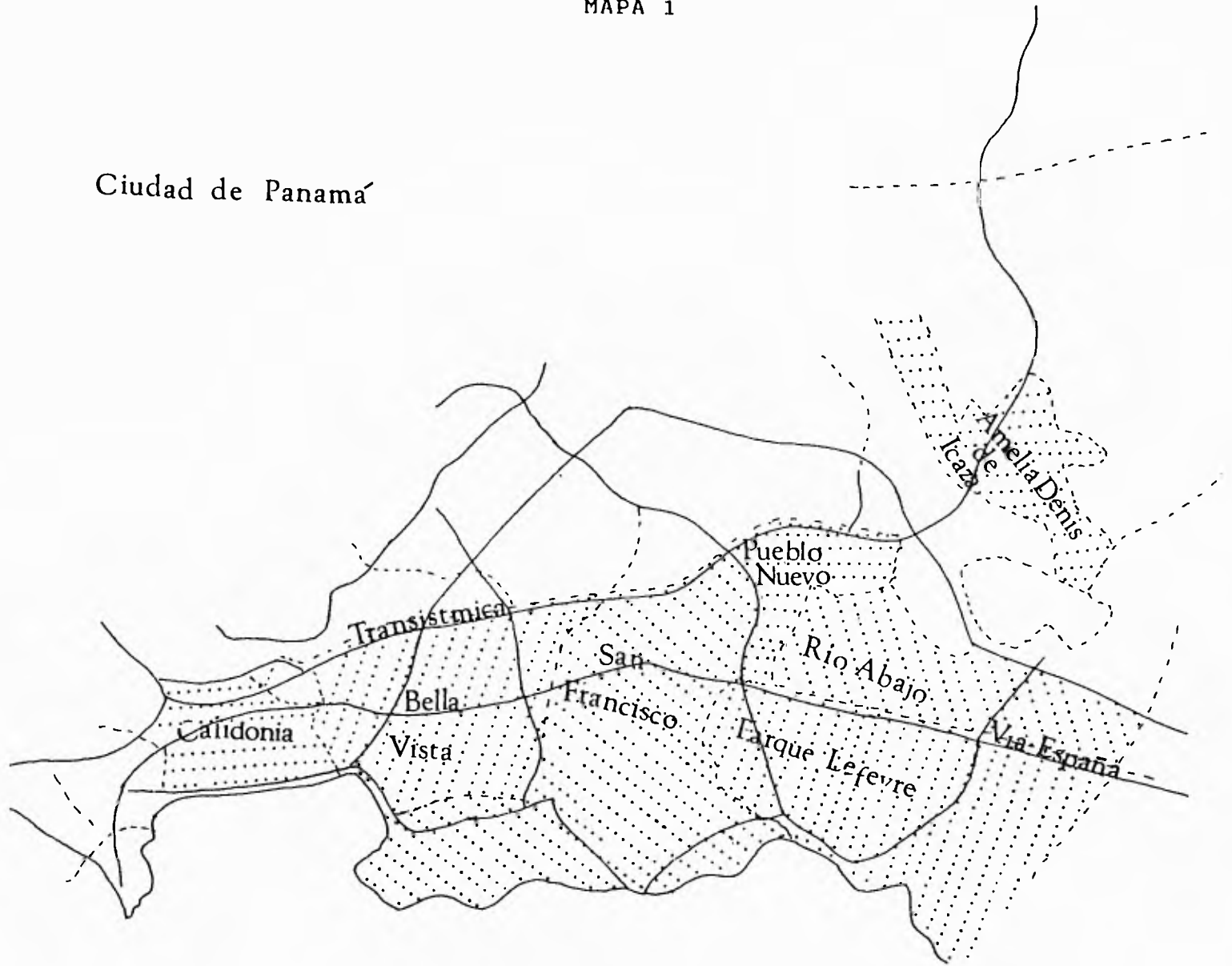
Solución fosfatada ph 9.0 1 volumen

Glicerol neutro 9 volúmenes

El pH se debe verificar en un pH metro

MAPA 1

Ciudad de Panamá



5. RESULTADOS Y DISCUSION

Los mosquitos mantenidos en las condiciones óptimas de 28°C y 80% de humedad relativa, 12 horas luz-oscuridad y con una alimentación adecuada, mostraron un crecimiento muy rápido, en donde las cuatro etapas larvales se desarrollaron en tres o cuatro días, siendo el crecimiento de los primeros estadios acelerado y el cuarto estadio más lento, lo que coincide con las observaciones hechas por Christophers (1960).

Mirsa (1960), realizó estudios sobre *Ae.aegypti* desarrollado en el laboratorio, observó que la coloración de las larvas en los primeros estadios larvales era claro.

Conforme iban madurando y aumentando de tamaño, éstas se volvieron más oscuras. Mis observaciones realizadas en el laboratorio sobre el crecimiento y desarrollo larvario concuerdan totalmente con las anotaciones realizadas por el autor mencionado anteriormente.

En los primeros estadios las larvas son muy activas, mientras que en las de cuarto estadio la actividad es menor.

Debido a la voracidad y velocidad al ingerir el alimento fué necesario proporcionárselos por lo menos una vez al día, por las mañanas y en algunas ocasiones fué necesario volver a hacerlo por la tarde. En general pude

observar que las larvas son capaces de ingerir cualquier partícula suspendida en el medio.

En ciertas ocasiones observé como en algunas de las bandejas en que se desprendió la capa de esmalte, las larvas se encontraban rascando esa área con sus mandíbulas, sobre todo las de menor tamaño. La actividad larvaria descrita anteriormente concuerda con los estudios realizados por Dadd, (1968) y Rashed en (1989). En ninguna ocasión observé canibalismo.

Al ser expuestas a una luz fluorescente, las larvas reaccionaron violentamente, desplazándose activamente con su característico movimiento serpentiforme hacia la zona en donde la intensidad de la luz era menor, agrupándose en forma de ovillos. De igual manera reaccionaron al golpear la bandeja. En posición de reposo las larvas se mantuvieron en posición vertical. Esta reacción a la luz y vibraciones fué también observada por Christophers (1960).

El tiempo de desarrollo observado de pupa a adulto fue de 24 a 36 horas, en las condiciones mantenidas en el insectario. Poco antes de pasar al estadio de pupa, las larvas de cuarto estadio permanecían inmóviles; luego mediante movimientos bruscos se desprendían de su cutícula y pasaban al estado de pupa. Las pupas al inicio eran de

color blanco; varias horas después adquirieron una coloración marrón oscuro.

Las pupas, en posición de reposo se mantienen en la superficie del agua. Al igual que las larvas mostraron gran sensibilidad a los cambios de luz y a las vibraciones o ruidos fuertes, desplazándose activamente debajo del agua.

El tamaño de las pupas no fué uniforme; se observaron dos tamaños y al momento de la emergencia se corroboró que las de menor tamaño correspondían a los machos, mientras que las más grandes correspondieron a las hembras. Momentos antes de emerger el adulto, la pupa permanecía inmóvil en la superficie del agua.

Nuestras observaciones coinciden con las realizadas por Mirsa (1960), Vargas (1968), Romoser (1975) y Christophers (1960).

Los machos fueron los primeros en emerger, su número fué superior al de las hembras. Varias horas después de la emergencia de las hembras, copulaban en repetidas ocasiones, inicialmente durante el vuelo y luego sobre una superficie sólida como las paredes de la jaula, contrario a las observaciones realizadas por Clements (1963). Pude observar en muchas ocasiones cópulas en superficies horizontales.

El primer grupo de larvas colectadas sirvió para un estudio piloto en que se verificaron cada uno de los pasos que seguiría el protocolo, en donde en lugar de virus se utilizó PBS para infectar el ratón. Los mosquitos alimentados con sangre de ratón no infectado en este estudio inicial fueron capaces de vivir hasta por tres meses.

Al introducir el ratón infectado con virus Den-1 en la jaula, los primeros en posarse sobre éste fueron los machos y luego las hembras, que se alimentaron con bastante avidez hasta quedar completamente llenas, lo cual se facilitó por la inmovilidad del ratón anestesiado.

En algunas ocasiones pude observar cópula, mientras las hembras se estaban alimentando, pero pocas veces, después de haber ingerido sangre.

Al revisar las jaulas con las hembras varias horas después de la ingesta de sangre, observé que el papel filtro colocado sobre el fondo de la jaula estaba lleno de manchas café oscuro, producto de las deyecciones de sangre digerida.

Al tercer día post-infección, al cambiar los algodones en donde se les suministraba agua a los mosquitos, observé gran cantidad de huevos que habían sido ovipositados sobre éstos. Fueron examinados al estereoscopio para observar su morfología y coloración. De

inmediato fueron descartados en Wescodyne y llevados a la autoclave.

La sangre obtenida del ojo del ratón al principio del experimento e inoculada en cultivos celulares (TRA-284) no desarrolló ningún efecto citopático durante el período de observación. Sin embargo en la prueba de fluorescencia indirecta, los resultados fueron positivos, lo que indicó que hubo viremia inducida por inoculación directa a la circulación. Se confirmó que el virus dengue no siempre produce efecto citopático en los cultivos celulares de TRA-284, (Kuno 1982).

De las suspensiones individuales de tórax y abdomen de *Ae.aegypti* cuyas cabezas resultaron negativas en la fluorescencia ninguna causó efecto citopático en cultivo celular, y además todas resultaron negativas en fluorescencia indirecta. Este resultado concuerda con los datos obtenidos en la fluorescencia de las cabezas de los mosquitos que indicaron que esos individuos no fueron infectados con el virus.

El total de mosquitos puestos a chupar en ratones virémicos fue de 1,333; por limitaciones en el uso de anticuerpos monoclonales se escogieron al azar 792 hembras de *Ae.aegypti* para examinar con la técnica de inmunofluorescencia indirecta; 458 de ellas, habían chupado 1000 pv, 136, 100 pv y 198, 10 pv. Se midió la

positividad en un promedio de 46% en los mosquitos infectados con 1000 partículas virales, en 7.3% de los infectados con 100 partículas virales, y en 7.07% de los infectados con 10 partículas virales (Cuadro.I)

La cepa de *Ae.aegypti* presente en la ciudad de Panamá es susceptible a infectarse por vía oral con el virus dengue-1.

Entre los mosquitos colectados en los corregimientos de Calidonia, Amelia Denis de Icaza y Rio Abajo e infectados con una dosis estimada de 1000 pv no hubo diferencias estadísticamente significativa en el grado de susceptibilidad, que fue de 78.1% para estos. Los corregimientos de Parque Lefevre, San Francisco y Bella Vista presentaban una susceptibilidad (13.1%) menor que en los primeros tres corregimientos. El corregimiento de Pueblo Nuevo presentó un grado de susceptibilidad intermedia(40%). Este resultado pareciera indicar la presencia de tres cepas de *Ae.aegypti* con distintos grados de susceptibilidad. Sin embargo, cuando analizamos los resultados obtenidos con mosquitos colectados en Rio Abajo y Pueblo Nuevo que habían sido infectados con un estimado de 100 pv, no observamos diferencia. Tampoco hubo diferencia entre mosquitos colectados en San Francisco, Rio Abajo y Pueblo Nuevo cuando fueron infectados con 10 pv. Por tanto asumiremos en el resto de nuestra discusión

que en la ciudad de Panamá solo está circulando una cepa de *Ae. aegypti*, y que la variación, es la que normalmente se observa en una población.

La susceptibilidad de mosquitos a infección con arbovirus y otros microorganismos para los cuales ellos sirven como vectores puede variar ampliamente entre diferentes especies, entre diferentes cepas geográficas de la misma especie y entre diferentes individuos de la misma cepa (Gubler, 1976).

La infección experimental de mosquitos con virus dengue indica que cepas particularmente susceptibles o resistentes a un serotipo son similarmente susceptibles o resistentes a otros serotipos de dengue (Gubler, 1978).

Gubler(1979) ha analizado la susceptibilidad a la infección oral con virus dengue a cepas de *Ae.aegypti* de origen geográfico diferente, observando una variación significativa en la susceptibilidad al virus dengue en las diferentes cepas estudiadas. Además la cantidad de virus requerido para infectar los mosquitos varía inversamente a la susceptibilidad de la cepa.

Al comparar los resultados obtenidos por Gubler con los nuestros, debemos considerar que tanto las técnicas como la cantidad de virus utilizada fueron distintos.

Gubler utilizó la vía oral pero con medios artificiales y altas dosis de virus (de 7.3 dex =59,858

pv/3 μ l a 8.1 dex = 377,678 pv/3 μ l) para infectar los mosquitos, mientras que nosotros utilizamos la vía oral pero con medios naturales (un animal vivo que mantuvo el virus circulando a una temperatura constante y proporcionó un medio estable). Además, todas las dosificaciones que utilizamos fueron bajas en comparación con los experimentos citados arriba porque nos interesaba conocer la susceptibilidad del mosquito y no su resistencia.

Otra diferencia significativa entre ambos estudios fue la procedencia de los mosquitos utilizados. Gubler infectó mosquitos de colonias establecidas. Se ha demostrado que la colonización prolongada ocasiona cambios en la susceptibilidad a infecciones con arbovirus cuando se compara con poblaciones naturales (Tesh, 1976). En nuestro estudio se utilizaron larvas colectadas directamente del campo y llevadas hasta adulto en el laboratorio. Este hecho puede ser la causa o una de las causas de la diferencia en la susceptibilidad medida en las poblaciones de *Ae. aegypti* naturales y las indicadas en la literatura para *Ae. aegypti* colonizados.

Basados en los resultados obtenidos en el Cuadro I, vemos como el *Ae. aegypti* presente en Panamá es capaz de infectarse oralmente con dosis de virus de 1000, 100 y 10 partículas virales, lo cual representa una cantidad sumamente baja. A la vez nos demuestra que es una cepa

muy susceptible y capaz de infectarse de huéspedes con viremias bajas.

Estudios realizados por Gubler (1981), en donde compara dos comunidades de Indonesia que sufrieron epidemias de dengue, muestran que una de las poblaciones humanas tuvo un brote explosivo con viremias altas (6.1 dex=1,258,925 pv/ml) y casos de DHF; y la otra comunidad sufrió una epidemia no explosiva que causó enfermedad benigna en el hombre y viremias bajas (5.2 dex=158,489 pv/ml). Sin embargo, *Ae.aegypti* fue capaz de infectarse con viremias bajas en el hombre y transmitir dengue. La enfermedad fue benigna y el brote no explosivo. En la epidemia en que *Ae.aegypti* se infectó con dosis altas del virus produjo DHF. Estos datos apoyan la teoría expuesta por Rosen (1985) que justifican la aparición de casos hemorrágicos en presencia de cepas virulentas de dengue y mosquitos capaces de replicar el virus con eficiencia.

La cantidad de virus requerido para infectar una proporción significativa de la población es un importante factor cuantitativo que afecta la competencia del vector, ya que la competencia vectorial de una cepa particular de mosquito esta dada por su habilidad de soportar la replicación viral.

Cepas de *Ae.aegypti* no endémicas son más susceptibles a la infección y es más probable que puedan transmitir el

virus. Los resultados de sus estudios son consistentes con la hipótesis de que una exposición crónica induce a la evolución de resistencia por parte del hospedero, lo cual ha sido observado en otros sistemas mosquito-parásito (Grimstad, 1977).

Panamá se reinfestó con *Ae.aegypti* en 1985, la última epidemia de dengue se presentó en 1942 (Rosen, 1958). Es probable que la población menor de 47 años no posee anticuerpos contra ninguno de los cuatro serotipos de dengue. Por esto la población de Panamá es muy susceptible de infectarse con el virus dengue.

En el Cuadro II se observa que el porcentaje de mosquitos positivos es de 55.5% para el día siete y 33% para el día 12, post-infección con 1000 pv, 12% para el día siete, 1.6% para el día doce post-infección con 100 pv, 13.5% para el día siete, 3.2% para el día 12 post-infección con 10 pv.

Debido a que no todas las muestras preparadas para inmunofluorescencia fueron analizadas pero que se hizo una selección al azar, la mayor cantidad de laminillas examinadas para 1,000 y 100 pv, fueron del día siete, como se aprecia en el Cuadro II, sin embargo para 10 pv la mayor cantidad de muestras examinadas correspondieron al día doce. Estos resultados indican que no es necesario mantener los mosquitos hasta el día doce, ya que al día

siete los mosquitos ya han replicado el virus, y se encuentran positivos por la prueba de inmunofluorescencia, acortando en cinco días el diagnóstico para el virus dengue-1.

CUADRO I. SUSCEPTIBILIDAD DE *Aedes aegypti* AL VIRUS DENGUE 1 EN PANAMA.

CORREGIMIENTO	MOSQUITOS		
	INFECTADOS	EXPUESTOS	%
<u>1000 PV/3μl*</u>			
CALIDONIA	38	41	92.687
A.D. ICAZA	40	50	80.0
RIO ABAJO	86	119	72.26
PUEBLO NUEVO	20	50	40.0
PARQUE LEFEVRE	8	45	17.77
SAN FRANCISCO	10	70	14.28
BELLA VISTA	8	83	9.63
SUBTOTAL	210	458	46.00
<u>100 PV/3μl</u>			
RIO ABAJO	8	88	9.09
PUEBLO NUEVO	2	48	4.16
SUBTOTAL	10	136	7.35
<u>10 PV/3μl</u>			
SAN FRANCISCO	3	40	7.5
RIO ABAJO	8	108	7.4
PUEBLO NUEVO	3	50	6.0
SUBTOTAL	14	198	7.07

* PV=unidades formadoras de placas.

CUADRO II. PORCENTAJE DE MOSQUITOS INFECTADOS EN LOS DIAS 7 Y 12.

CORREGIMIENTO	DIA 7		DIA 12		MOSQUITOS	
	+/T	%	+/T	%	INF/EX*	%
<u>1000 PV/3µl</u>						
CALIDONIA	28/ 28	100	10/ 13	77	38/ 41	92.68
A.D. ICAZA	24/ 24	100	16/ 26	61	40/ 50	80
RIO ABAJO	74/103	72	12/ 16	75	86/119	72.26
PUEBLO NUEVO	7/ 22	32	13/ 28	46	20/ 50	40
PARQUE LEFEVRE	5/ 15	33	3/ 30	10	8/ 45	17.77
SAN FRANCISCO	4/ 26	15	6/ 44	13	10/ 70	14.28
BELLAVISTA	3/ 43	7	5/ 40	12	8/ 83	9.63
SUBTOTAL	145/261	55	65/197	33	210/458	46
<u>100 PV/3µl</u>						
RIO ABAJO	7/ 58	12	1/30	3	8/ 88	9.09
PUEBLO NUEVO	2/ 17	11	0/31	-	2/ 48	4.16
SUBTOTAL	9/ 75	12	1/61	1.6	10/136	7.35
<u>10 PV/3µl</u>						
SAN FRANCISCO	1/ 13	7.7	2/27	7.4	3/ 40	7.5
RIO ABAJO	7/ 48	14	1/60	1.6	8/108	7.4
PUEBLO NUEVO	2/ 13	15	1/37	2.7	3/ 50	6
SUBTOTAL	10/ 74	13.5	4/124	3.2	14/198	7.07

PV = partículas virales

+/T = positivos/total examinados

* INF/EX = mosquitos expuestos/mosquitos infectados.

6. CONCLUSIONES

- La cepa de *Ae.aegypti* presente en la Ciudad de Panamá es susceptible al virus dengue-1 porque fué capaz de infectarse con dosis bajas de virus, bajo condiciones de laboratorio.
- Por ser susceptible a bajas dosis de virus, la cepa de *Ae.aegypti* presente en la ciudad de Panamá, es un vector competente que podría sostener la transmisión del virus durante un brote de dengue.
- Los mosquitos son capaces de replicar el virus hasta dosis fácilmente detectables con la prueba de inmunofluorescencia desde el día siete después de infectados acortando el tiempo del diagnóstico para el virus dengue-1.

7. LITERATURA CITADA

- Bar-Zeev, M., H.I. Maibach y A.A. Khan. 1977. Studies on the attraction of *Ae. aegypti* (Diptera: Culicidae) to man. *J. Med. Entomol.* 14 (1):113-120.
- Benenson, A. Ed. 1980. El Control de las Enfermedades Transmisibles en el Hombre. OPS/OMS. Publicación Científica No. 442. 486 pags.
- Carpenter, S.J. y W.J. La Casse. 1955. Mosquitoes of North America. University of California Press. 360 pags.
- Christophers, S. R. 1960. *Aedes aegypti* (L). The Yellow Fever Mosquito. Cambridge at the University Press. 738 pags.
- Clements, A.N. 1963. The Physiology of Mosquitoes. The Mac Millan Company. New York. 393 pags.
- Craig, G.B. y W.A. Hickey. 1967. Genetics of *Ae. aegypti*. Pages 67-131. EN: J. W. Wright and R. Pal, eds. Genetics of Insect Vectors of Disease. Elsevier Publishing Co., Amsterdam.
- Dadd, R.H. 1968. A method for comparing feeding rates in mosquito larvae. *Mosquito News.* 28 (2):226-230.
- Dutary, B., J.E. Rozette. y C. Campos. 1989. Situación actual del mosquito *Ae. aegypti* en el Area Metropolitana de la Ciudad de Panamá. *Revista Médica de Panamá.* 14.(2):67-78.

- Figueroa, M. 1983. Enfermedades Virales en Centroamerica. Universidad Nacional Autónoma de Honduras. Lithopress Industrial, S.A. Tegucigalpa, Honduras. 244 pags.
- Forattini, O.P. 1965. Entomología Médica. Vol. II. Editoria da Universidade de Sao Paulo. 506 pags.
- Gerber, E. 1970. Manual for mosquito rearing and experimental techniques. *AMCA. Bulletin Mosquito Rearing.* (5): 53-55.
- Gouck, H.K. 1972. Host preferences of various strains of *Ae. aegypti* and *Ae. simpsoni* as determined by an olfactometer. *Bull. Wld. Hlth. Org.* 47: 680-683.
- Grimstad, P.R., G.B. Craig, Jr., Q.E. Ross y T.M. Yuill. 1977. *Aedes triseriatus* and la Crosse virus: Geographic variation in vector susceptibility and ability to transmit. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 26(5): 990-996.
- Gubler, D. y L. Rosen. 1976. Variation among geographic strains of *Ae. albopictus* in susceptibility to infection with dengue viruses. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 25(2): 318-325.
- Gubler, D.J., D. Reed., L. Rosen y J. Hitchcock Jr. 1978. Epidemiologic, clinical and virologic observations on dengue in the Kingdom of Tonga. *Am J Trop. Med. Hyg.* 27(3): 581-589.
- Gubler, D.J., N. Tan, H. Saipan y S. Saroso. 1979. Variation in Susceptibility to oral infection with dengue viruses among Geographic strains of *Ae. aegypti* *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 28(6). Pags: 1045-1052.
- Gubler, D.J., W. Suharyono., I. Lubis., S. Eram y S. Gunarso. 1981. Epidemic dengue-3 in Central Java, associated with low viremia in man. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 30(5): 1094-1099.

- Gubler, D.J. 1988. Dengue, pp:223-260 EN: Monath, T. ED. The Arboviruses: Epidemiology and Ecology. Vol. II. CRC Press.
- Halstead, S.B. 1980. Dengue haemorrhagic fever. A public health problem and a field for research. *Bull. WHO.* 58:1-21.
- Halstead, S.B. 1981. The pathogenesis of dengue. *Am. J. Epidemiol.* 114(5): 632-648.
- Halstead, S. B. 1984. Selective primary health care: Strategies for control of disease in the developing World. XI. Dengue. *Review of Infectious Diseases.* Vol.6. No.2: 251-264.
- Hardy, L. H., E. J. Houk, L. Kramer y C.Reeves. 1983. Intrinsic factors affecting vector competence of mosquitoes for arboviruses. *Ann. Rev. Entomol.* 28: 29-62.
- Harrison, V.R., K.Eckels, J.W. Sagartz y P.Russell. 1977. Virulence and immunogenicity of a temperature sensitive dengue-2 virus in lower primates. *Infection an Immunity.* 18(1): 151-156.
- Henchall, E.A, M.K. Gentry, J.M. McCown y G.Brandt. 1982. Dengue virus-specific and Flavivirus group determinants identified with monoclonal antibodies by indirect immunofluorescence. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 31(4): 830-836.
- Horsfall, W.R. 1955. Mosquitoes. Their Bionomics and Relation to Disease. The Ronald Press Company. New York. 723 pags.
- Huang, Y.M. 1977. Medical Entomology studies. Contributions of the American Entomological Institute. 14(1): 1-12.

- Karabatsos, N. Ed. 1985-88. International Catalogue of Arboviruses. American Society of Tropical Medicine and Hygiene.
- Kuno, G. 1982. Dengue virus replication in a polyploid mosquito cell culture grown in serum-free medium. *J. Clin. Microbiol.*, 16(5):851-855.
- Kliks, S., S.Nimmanitya., A.Nisalak y D.S.Burke. 1988. Evidence that maternal dengue antibodies are important in the development of dengue hemorrhagic fever in infants. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 38(2): 411-19.
- Lorenz, L., B.J.Beatty., T.H.G.Aitken., G.P.Wallis y W.Tabachnick. 1984. The effect of colonization upon *Ae.Aegypti* susceptibility to oral infection with yellow fever virus. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 33(4): 690-694.
- Lumsden, W.H.R. 1957. The activity cycle of domestic *Aedes* (*Stegomyia*) *aegypti* (L). (Diptera:Culicidae) in southern province, Tanganyika. *Bull.Entomol. Research*. Vol.48. Part.4. pags:769-782.
- Mattingly, P.F. 1957. Genetical aspects of the *Aedes aegypti* problem. Taxonomy and bionomics. *Ann. Trop. Med. Parasit.* 51: 392-408.
- Mattingly, P.F. 1958. Genetical aspects of the *Aedes aegypti* problem. II. Disease relationships, genetics and control. *Ann. Trop. Med. Parasit.* 52: 5-17.
- Mayer, M.S. y J.D.James. 1970. Attraction of *Ae.aegypti*. Velocity of reaction to host with and without additional carbon dioxide. *Ent. Exp.& Appl.* 13:47-53.

- Mirsa, A. 1960. Datos experimentales sobre aspectos bioecológicos de *Ae.aegypti* (L) desarrollados en el laboratorio. *Revista de Sanidad y Asistencia Social*. No.3 y 4. Caracas. Venezuela. 341 pags.
- Mitchell, C.J., D.B.Francy y T.Monath. 1980. Arthropod vectors, pp: 313-379 EN: Monath,T. Ed. St. Louis Encephalitis. American Public Health Association.
- Mitchell, C. J. 1983. Mosquito Vector Competence and Arboviruses, pp: 63-92 EN: Harris, K.F. Ed. Current Topics in Vector Research. Vol. 1. Praeger Publishers.
- Monath, T.P. 1988. The Arboviruses: Epidemiology and Ecology.Vol.I. CRC. Press, Inc. Florida. 329 pags.
- Nelson, M.J. 1986. *Ae.aegypti*: Biology and Ecology. Pan American Health Organization. Washington,D.C. 50 pags.
- Nelson,M.J., L.S.Self., C.P.Pant y S.Usman. 1978. Diurnal periodicity of attraction to human bait of *Ae.aegypti* (Diptera:Culicidae) in Jakarta, Indonesia. *J. Med. Entomol.* 14 (5): 505-510.
- Oficina Panamericana de la Salud. 1989. El dengue en las Américas. 1980-87. *Boletín Epidemiológico*. OPS. 10(1):1-8.
- Pang.T. 1983. Delayed-type hypersensitivity: Probable role in the pathogenesis of dengue hemorrhagic fever/dengue shock syndrome. *Reviews of infectious diseases*. 5(2): 346-352.
- Petersen, J.L. 1977. Behavioral differences in two sub-species of *Ae.aegypti* (L) (Diptera:Culicidae) in East Africa. Tesis de Doctorado. Notre Dame. Indiana.

Peralta,PH: Comunicación Personal.

Rashed,S. y M.S.Mulla. 1989. Factors influencing ingestion of particulate materials by mosquito larvae (Diptera: Culicidae). *J. Med. Entomol.* 26(3):210-216

Rivers,T.M. y F.Horsfall. 1965. Diagnóstico y Tratamiento de las Enfermedades por Virus y Rickettsias. 3a. Ed. Editorial Interamericana. 774 pags.

Roberts,D.R. y B.P.Hsi. 1977. A method of evaluating ovipositional attractants of *Ae.aegypti* (Diptera: Culicidae), with preliminary results. *J. Med. Entomol.* 14(1):129-131.

Romoser,W.S. 1975. Buoyancy and ventilation in *Aedes aegypti* (L) Pupae (Diptera: Culicidae). *J. Med. Entomol.* 12(5): 547-550.

Rosen,L. 1958. Observations on the epidemiology of dengue in Panama. *Am. J. Hyg.* 68: 45-58.

Rosen,L., D.Shroyer., R.Tesh., J. Freier y J.Ching Lien. 1983. Transovarial transmission of dengue viruses by mosquitoes: *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 32(5): 1108-1119.

Rosen,L., LL.Roseboom., D.J.Gubler., J.CH.Lien y B. Chaniotis. 1985. Comparative susceptibility of mosquito species and strains to oral and parenteral infection with dengue and Japanese encephalitis viruses. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 34(3): 603-615.

Siler,J.F., M.W.Hall y A.Parker. 1926. Dengue. Manila. Bureau of Printing. 484 pags.

Suarez,M.F. y M.J.Nelson. 1981. Registro de altitud del *Aedes aegypti* en Colombia. *Biomedica.* 1(4):225.

- Tesh, R.B., D.Gubler y L.Rosen. 1976. Variation among geographic strains of *Aedes albopictus* in susceptibility to infection with Chikungunya virus. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 25(2): 326-335.
- Tinker, M. 1974. *Ae. aegypti* larval habitats in Surinam. Reprint from the *Bulletin of the Pan American Health Organization*. Vol.VIII, No.4. 293-301.
- Trips, M., G.A.H.McClelland., J.D.Gillett., C.Teesdale y T.R.Rao. 1971. Diel periodicity in the landing of *Ae. aegypti* on man in Tanzania. WHO. 11 pags.
- Trips, M. y W.Hausermann. 1975. Demonstration of differential domesticity of *Ae. aegypti* (L)(Diptera: Culicidae) in Africa by mark-release-recapture. *Bull. Ent. Res.* 65: 199-208.
- Trips, M. 1977. Autogeny in diverse populations of *Ae. aegypti* from east Africa. *Tropenmed. Parasit.* 28: 77-82.
- Trips, M. y W.Hausermann. 1986. Dispersal and other population parameters of *Ae. aegypti* in an African Village and their significance in Epidemiology of Vector-Borne-Diseases. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 35(6): 1263-1279.
- Vargas, M. 1968. Sexual dimorphism of larvae and pupae of *Ae. aegypti* (L). *Mosquito News.* 28(3): 374-379.
- Watts, D., D.Burke., B.Harrison., R.Whitmire y A. Nisalak. 1987. Effect of temperature on the vector efficiency of *Ae. aegypti* for dengue-2 virus. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*; 36(1): 143-152.
- World Health Organization. 1986. Dengue Haemorrhagic Fever. Diagnosis, Treatment and Control. WHO. Geneva. 58 pags.

Yasuno, M. y R.J.Tonn. 1970. A study of biting habits of *Ae.aegypti* in Bangkok, Thailand. World Health Organization. (WHO). 19 pags.