



DETECCIÓN MOLECULAR DEL GENOMA DEL VIRUS DE LA FIEBRE AMARILLA EN MOSQUITOS *Aedes Aegypti*

Cabanne, G. S. / Liotta, D. J. / Tonon, S. A.

Laboratorio de Biología Molecular Aplicada. Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales - UNaM - Félix de Azara 1552, Posadas, Misiones, (3300) Argentina.

e-mail: scabanne@fceqyn.unam.edu.ar

MOLECULAR DETECTION OF THE YELLOW FEVER VIRUS GENOME IN *Aedes Aegypti* MOSQUITOES

ABSTRACT

Detection of Yellow Fever infected mosquitoes allows the implementation of field-surveillance studies and analytical laboratory approaches. This paper reports an optimized method for detection of the Yellow Fever virus genome in *Aedes aegypti* mosquitoes samples. An initial RNA extraction step, followed by a silica particle purification, produced suitable samples. A distinctive 281 bp fragment from the NS1 viral gene was amplified by *seminested* RT-PCR. The sensitivity limit of the assay was estimated at 2.1×10^4 PFU/ml and the maximum mosquitoes number per sample was 15.

KEY WORDS: yellow fever, RT-PCR, *Aedes aegypti*, molecular detection.

RESUMEN

La detección de mosquitos infectados con el virus de la Fiebre Amarilla permite establecer estudios de vigilancia temprana en campo y diversos análisis en el laboratorio. En este trabajo se desarrolla y optimiza un protocolo para la detección del genoma del virus de la Fiebre Amarilla en mosquitos *Aedes aegypti*. En la extracción de ARN total se utilizó un protocolo convencional combinado con una purificación con micropartículas de sílica. Para la detección, se amplificó por RT-PCR *seminested* una región de 281 pb del gen NS1, lográndose una sensibilidad límite de $2,1 \times 10^4$ PFU/ ml y un número máximo admitido de 15 mosquitos por muestra.

PALABRAS CLAVES: fiebre amarilla, RT-PCR, *Aedes aegypti*, detección molecular.

INTRODUCCIÓN

El virus de la Fiebre Amarilla (FA) posee envoltura lipoproteica, genoma de ARN de 10,8 kb de cadena simple con polaridad positiva, y junto a otras especies virales como Dengue, Encefalitis de San Luis y West Nile, pertenece al género *Flavivirus*. FA es un arbovirus distintivo, prototipo de la familia *Flaviviridae*, la que también incluye a los géneros *Pestivirus* y *Hepacivirus* [1].

Los arbovirus (del inglés *arthropod-borne virus*) son una agrupación ecológica de virus de diversas taxa, que se replican en los tejidos de vertebrados generando viremia, y son mantenidos en la naturaleza mediante la transmisión biológica entre vertebrados susceptibles y vectores artrópodos hematófagos. Cuando un artrópodo susceptible se alimenta de un vertebrado con viremia, resulta infectado y se torna, de por vida, capaz de transmitir el virus a otro hospedador susceptible. Estos eventos se conocen como **ciclo clásico de transmisión** de un arbovirus, o ciclo epidemiológico, en donde existe una interacción dinámica entre agente viral, hospedador y vector [2].

El FA está presente en gran parte de la región Etíope y en el Neotrópico, pero no en la región Asiática, y posee dos ciclos de transmisión denominados selvático y urbano [3].

En América predomina el ciclo selvático, participando como vectores y reservorio mosquitos primatófilos de los géneros *Haemagogus* y *Sabethes*, mientras que diversas especies de monos actúan como hospedadores. En este ciclo, el humano es un elemento casual. Por el contrario, el ciclo urbano involucra a mosquitos *Aedes aegypti* como vectores y reservorio, siendo el humano el único hospedador [4].

La Fiebre Amarilla es una virosis emergente. El aumento de la densidad poblacional de *A. aegypti*, particularmente en América [5], combinado con factores socioecológicos, como el crecimiento demográfico humano descontrolado y la falta de servicios acordes, potencian la posibilidad de nuevos brotes urbanos, como el ocurrido en Bolivia durante 1998 [6]. Los últimos casos oficiales en humanos de Fiebre Amarilla en Argentina datan de fines de la década de 1960, y ocurriendo en la provincia de Misiones. Recientemente (julio de 2001) fuentes del Ministerio de Salud de la Nación (SINAVE, Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica), informaron la existencia de un brote zoonótico al sur del Estado de Rio Grande do Sul (Brasil), junto a la frontera con Argentina, a la altura de las provincias de Misiones y Corrientes (datos no publicados). Se debe recalcar que la totalidad de las poblaciones urbanas de riesgo de las provincias de

Misiones y Corrientes poseen densidades de mosquitos *A. aegypti* superiores al mínimo propuesto para mantener un ciclo de transmisión viral urbano; y dado esto, las organizaciones de salud pública intervinientes impulsaron distintas medidas preventivas habituales, como vacunaciones y vigilancia viral en mosquitos y hospedadores naturales.

La infección de humanos con FA debuta con una primera etapa de síntomas febriles indiferenciados, fácilmente confundidos con otras dolencias comunes tropicales, como ser Dengue, continuándose con una segunda etapa más grave de mortalidad elevada (20 al 50% [7]).

La posibilidad de detectar mosquitos infectados con FA permite establecer sistemas de detección temprana a campo y estudios de vectores en laboratorio. El monitoreo de mosquitos infectados admite el desarrollo estructurado de estrategias de vigilancia y control de brotes, como se ha comprobado con el flavivirus dengue, produciendo un impacto muy positivo en salud pública [8].

Para este fin se han propuesto diversas metodologías: a) las clásicas consistentes en la detección de partículas virales viables (aislamiento viral), empleando distintos sistemas biológicos, como las líneas celulares C6/36, AP61, o ratones y mosquitos para inoculación; b) las inmunológicas, en donde los antígenos virales pueden ser detectados en el insecto por inmunofluorescencia directa o indirecta (IFI e IF), o por ensayos ELISA (Enzyme Linked Immunoassay) de captura de antígenos; y c) las moleculares, en donde la presencia del virus se evidencia demostrando la presencia inequívoca de sus ácidos nucleicos en las muestras de artrópodos. En este contexto, la aplicación de técnicas moleculares, en especial RT-PCR (Transcripción reversa asociada a la reacción en cadena de la polimerasa), se destacan por su rapidez, sensibilidad y alta especificidad.

Sin embargo, para minimizar los efectos de inhibidores enzimáticos intrínsecos de insectos se requieren sistemas efectivos de aislamiento y purificación de genoma viral; como en diversos estudios con virus Dengue, en donde se empleó la captura de ARN blanco a través de sondas [8, 9, 10 y 11].

En los últimos diez años se han publicado diversos protocolos para la detección molecular de FA en muestras clínicas [12; 10; 13; 14; 15]. Pero, a diferencia de lo que ocurre con los virus Dengue o West Nile [16], la aplicación de las mismas a muestras de artrópodos está poco desarrollada y difundida.

En este trabajo se desarrolla un protocolo optimizado para la detección del genoma de FA en muestras de mosquitos *Aedes aegypti* por RT-PCR.

MATERIALES Y MÉTODOS

Controles

Como control positivo viral se utilizó la cepa atenuada vacunal 17 D ("Stamaril Pasteur", Pasteur Mérieux, Lyon, France). El título viral provisto por el fabricante se utilizó como referencia control (una dosis= $4,8 \times 10^4$ PFU –*Plaque Forming Units*- [17]).

El control de mosquitos *A. aegypti* positivos para FA consistió en cabezas de insectos emergidos en el laboratorio con virus patrón agregado previamente a la extracción de ARN total. Se utilizaron cabezas debido a que durante la infección natural el virus se aloja en distintos órganos del mosquito, como ser glándulas salivales y el sistema nervioso.

Como mosquitos control negativo para FA, se emplearon ejemplares emergidos en el laboratorio de larvas colectadas en el campo, teniendo en cuenta la tasa de transmisión vertical no significativa en poblaciones naturales [18].

Extracción de ARN total de *Aedes aegypti*

El material crudo (lotes de 1 a 25 cabezas de mosquitos, o partículas virales) se resuspendió en 100 iL de PBS frío y se agregó 100 iL de Buffer de Lisis (Tiocianato de Guanidinio 6 M -Promega, Ma, USA-, Citrato de Sodio 50 mM, Sarkosil 1%, ARNt 20 ig/ml y β -Mercaptoetanol 100 mM, en agua libre de ARNasas). Se homogenizó el material en un mortero de vidrio estéril, incubándose el homogenado por 10 min. a temperatura ambiente. Se hicieron dos extracciones con 200 iL de fenol: cloroformo: alcohol isoamílico 25: 24: 1 (pH 8 o pH 5,5), y se agregaron 7 iL de partículas de sílica tratadas según Boom

[19] (Sigma, St. Louis, USA). Se mezcló suavemente y se incubó por 7 min. a temperatura ambiente. Se centrifugó por 5 seg. a 12000 RPM descartándose el sobrenadante. Se hicieron dos lavados sucesivos del pellet con 200 iL de Buffer de Lavado frío (Tris-ClH 10 mM, ClNa 1 M, Etanol 50% en agua libre de ARNasas) y se centrifugó 5 seg. a 12000 RPM para eliminar el sobrenadante. El ARN total se resuspendió en 15 iL de Solución de Resuspensión (Agua libre de ARNasas, DTT 100mM, inhibidor de ARNasas RNase OUTq 40 U/iL-GBCO, BRL, USA-). Se incubó durante 5 a 7 min. a 50-55 °C, agitando cada 2 min., y se centrifugó por 2 min. a 12000 RPM. El sobrenadante con el ARN total se transfirió a otro tubo y se lo conservó -20 °C.

RT-PCR *seminested* para la amplificación de una región del gen NS1 del genoma del virus de la Fiebre amarilla

Empleando los cebadores publicados por Kuno [14], **YF1945R** (*down*): CAC TTT CAC CTG CAT CAC AAC A, **YF-S10** (*up*): GTA ACA GTT ACA TCG CTG AG y **YF-C10** (*down nested*): AGC AAG AAA CAT GTC CAC CA, se amplificó un fragmento de 281 pares de bases (pb) de la región NS1 del genoma de FA. En la Figura 1 se detalla esquemáticamente la reacción.

RT y primera ronda de PCR: la RT y primera ronda de PCR se realizaron en un solo tubo, con una sola enzima. Para la RT se utilizaron 4,3 iL del ARN total extraído (indistintamente del número de cabezas de mosquitos inicial de la muestra, como es forma habitual en este tipo de metodología [8, 9, 10 y 11]), con la siguiente mezcla de reacción: 1X de Buffer de transcripción reversa (10 mM Tris-ClH pH 8,3 y 90 mM ClK), 1mM

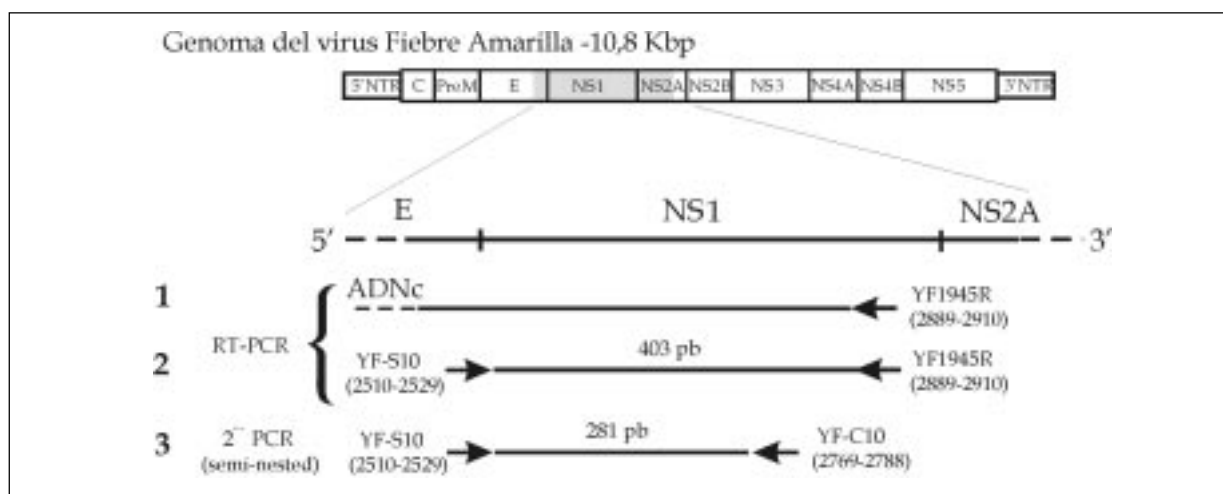


FIGURA 1: esquema de RT-PCR seminested 1: ADNc producto de la retro-transcripción a partir del cebador YF1945R. 2: primera ronda de PCR, aplicando los cebadores YF-S10 e YF1945R. 3: segunda ronda de PCR (*seminested*) aplicando los cebadores YF-S10 e YF-C10. Los números entre paréntesis muestran la posición de hibridación de cada cebador en el genoma viral.

de Cl_2Mn , 200 iM de cada dNTP, 5mM de DTT, 20 U de inhibidor de ARNasas, 1,25 iM del cebador YF1945R, 0,25 U/iL de la Transcriptasa reversa *Tth* (Promega, Ma, USA) y agua libre de nucleasas hasta completar 10iL. El perfil térmico empleado comprendió: tres min. a 85°C, y RT de tres segmentos, 10 min. a 50°C, 10 min. a 55°C y 20 min. a 60°C. A continuación, se agregaron a cada tubo de reacción: Buffer Quelante 1x (10 mM Tris-CIH pH 8,3, 100mM ClK, 0,75 mM EGTA 0,05% Tween q 20, 5% Glicerol), 1 mM de Cl_2Mg , 200 iM de cada dNTP, 1iM del cebador YF-S10, 1iM del cebador YF1945R, y agua miliQ a volumen final de 50 iL. Cada tubo se centrifugó a velocidad máxima 30 seg., y se desnaturalizó el híbrido ADNc:ARN 3 min. a 92°C. El perfil térmico consistió en 30 ciclos de 40 seg. a 92°C, 45 seg. a 50°C y 45 seg. a 70°C.

PCR de segunda ronda (*seminested*): se emplearon 2,5 iL del producto de la primer ronda. La mezcla de reacción consistió en: 1X Buffer de PCR (10 mM Tris-CIH pH 9, 50 mM ClK, 0,1% Tritonq X-100) 1,5 mM de Cl_2Mg , 200 iM de cada dNTP, 1iM de los cebadores YF-S10 e YF-C10, 1 U de *Taq* pol (Promega, Ma, USA), y agua miliQ hasta completar 25 iL. Para la amplificación se realizó una desnaturalización inicial de 2 min. a 92°C, y 30 ciclos posteriores de: 45 seg. a 92°C por, 45 seg. a 45°C y 45 seg. a 72°C.

La detección de los productos amplificados se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa (Promega, Ma, USA) al 1,5% teñido con Bromuro de Etidio. Se utilizaron 15 iL de cada reacción, y se aplicó 5 V/cm durante 90 min.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Extracción de ARN total

El proceso de extracción de ARN total es uno de los determinantes de la sensibilidad del sistema [14]. El ARN resultante debe ser de máxima pureza para evitar la presencia de interferentes y ARNasas en las reacciones subsiguientes.

Para la extracción de ARN total de muestras de mosquitos se combinó un paso inicial de lisis por tiocianato de guanidinio con una doble extracción orgánica con fenol y cloroformo [20]. La lisis por tiocianato de guanidinio se adoptó debido a su efectividad en la desactivación de ARNasas [21]. La extracción orgánica tuvo el fin de separar el ARN total de los demás elementos de mosquitos, entre los cuales se encuentra su ADN y otras sustancias capaces de actuar como inhibidores enzimáticos o como generadores de productos no específicos. Se ensayaron soluciones de fenol: cloroformo: alcohol

isoamílico con pH 8 y 5, resultando la última condición más efectiva en la purificación del ARN.

Para el paso de purificación y concentración del ARN total se empleó la técnica propuesta por Boom, empleando micropartículas de silicio [19].

El rendimiento medio de la extracción para las muestras de cinco cabezas de mosquitos fue de 22 iL de ARN total.

Parámetros de las reacciones de RT-PCR y amplificación de controles virales 17D

Para la RT y primer PCR se optó por la enzima *Tth* pol dada su funcionalidad dual, esto es, de acuerdo con las condiciones salinas del medio actúa como retrotranscriptasa (en presencia de Mn^{++}) o ADN polimerasa (en presencia de Mg^{++}). Esto permitió la realización de las reacciones de RT y primer PCR en un mismo tubo, minimizando así los riesgos potenciales de contaminación que afectan a las técnicas moleculares amplificativas.

La implementación de un ensayo tipo *seminested*, permitió incrementar la especificidad y sensibilidad de la amplificación inicial [9, 20]. Además, el sistema de cebadores utilizados fue seleccionado sobre la base de los pequeños amplicones que produce (403 pb y 281 pb). Esto facilita la reacción general necesitando un ARN inicial de menor longitud, como es posible encontrar en muestras biológicas complejas o parcialmente degradadas.

La puesta a punto del protocolo definitivo de detección del genoma viral requirió diversos ensayos sobre un método preliminar, empleando controles y variando diversos parámetros de reacción.

En un primer experimento se establecieron: la efectividad de los cebadores seleccionados para generar el producto esperado, el perfil térmico de RT propuesto, y las concentraciones a emplear de las enzimas *Tth* y *Taq* pol. La concentración óptima de Cl_2Mg para la segunda ronda se estableció empleando cantidades variables de ARN viral de 17D por reacción ($4,8 \times 10^4$, $4,8 \times 10^3$ y $4,8 \times 10^2$ PFU totales), diversas concentraciones de Cl_2Mg (1,5 mM, 2,5 mM y 3,5 mM), aplicándose 1,25 U de *Taq* pol.

En todas las muestras conteniendo $4,8 \times 10^4$ y $4,8 \times 10^3$ PFU se obtuvo el producto esperado de 281 pb. Se estableció que 1,5 mM de Cl_2Mg fue la concentración óptima para la segunda ronda. Las muestras con $4,8 \times 10^2$ PFU/reacción presentaron en esta primera experiencia solo bandas inespecíficas.

Amplificación de controles de mosquitos

Se analizó la capacidad de los métodos de purificación de ARN total y RT-PCR, propuestos originalmente, para la detección de ARN viral en muestras de mosquito.

Se comprobó el pH óptimo de la solución de fenol: cloroformo: alcohol isoamílico, el rango de números de cabezas de mosquito en que el protocolo se desempeñó aceptablemente, y se investigó la presencia de productos de RT-PCR inespecíficos en muestras de mosquitos negativos.

Las muestras analizadas consistieron en lotes con diversos números de cabezas de mosquitos control *Aedes aegypti* (5 a 25 cabezas), a los que se les agregó $4,8 \times 10^3$ PFU de virus control 17D, previo a la purificación de ARN total. Los resultados se presentan en la Figura 2.

En la muestra de mosquitos sin agregado de ARN viral, se observó amplificación inespecífica (Figura 2, calle 1), con bandas de aproximadamente 380 pb y 300 pb.

En las muestras de mosquitos con virus agregado se obtuvo el amplicón específico de 281 pb, en conjunto con productos inespecíficos de peso molecular cercano, atribuibles a amplificación de secuencias de mosquito (Figura 2, calle 2 y 3).

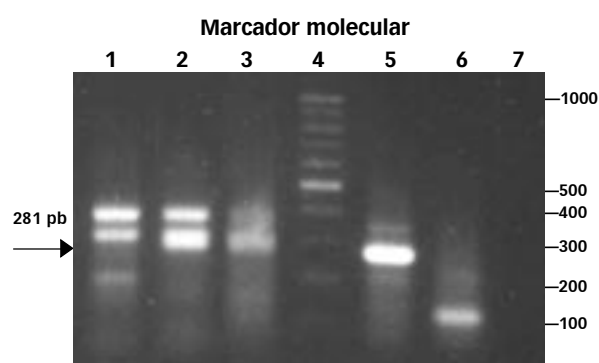


FIGURA 2: RT-PCR de muestras de mosquitos con agregado de virus FA control 17D. Calle 1: muestra de 5 cabezas sin agregado de virus. Calle 2: muestra de 5 cabezas con agregado de $4,8 \times 10^3$ PFU/reacción. Calle 3: muestra de 25 cabezas con $4,8 \times 10^3$ PFU/reacción. Calle 4: marcador 100 pb. Calle 5: $4,8 \times 10^3$ PFU de 17D. Calle 6: ARN viral de $4,8 \times 10^2$ PFU de 17D. Calle 7: control negativo, agua como blanco.

En las muestras con mayor número de cabezas (Figura 2, calle 3) se observó una pérdida en la calidad de la reacción, denotada por la disminución de la intensidad de los productos, probablemente debido a interferentes en la muestra.

La complejidad de la muestra bajo análisis, conteniendo ácidos nucleicos de mosquitos y otras sustancias copurificadas con estos, podrían ser la causa de los productos inespecíficos e interferencia en la RT-PCR; en coincidencia con los resultados obtenidos por otros autores al intentar detectar Dengue en *A. aegypti* y *A. albopictus* [8, 9 y 22].

Dado que el principal problema encontrado fue la generación de productos inespecíficos que dificultaron la interpretación de los datos, y no una inhibición de reacción como se esperaba en un primer momento, como primera hipótesis de trabajo se planteó que el ADN de mosquito remanente en las muestras podría estar sirviendo como blanco no específico en la reacción de amplificación. Para minimizar esta posibilidad se incorporó al protocolo definitivo un paso de extracción orgánica a pH ácido (pH 5), propiciando la purificación diferencial de ARN total. Esto favoreció la disminución sustancial de los productos inespecíficos, lográndose distinguir inequívocamente el amplicón viral.

Efectividad de la técnica con muestras de mosquitos

La efectividad del protocolo definitivo para detectar el genoma viral en muestras de mosquitos se analizó mediante un ensayo con lotes de *A. aegypti* adultos capturados a campo, y mosquitos control emergidos de larvas en laboratorio con partículas virales adicionadas.

Los resultados se presentan en la Figura 3. Todos los lotes de mosquitos de campo fueron negativos para Fiebre Amarilla y presentaron los patrones de amplificación inespecífica distintiva de las muestras negativas (Figura 3, calles 3 a 6). La muestra control positivo presentó la banda viral esperada de 281 pb, y solo esbozos de productos inespecíficos, comprobándose la efectividad del paso de extracción fenólica ácida incorporada (Figura 3, calle 2).

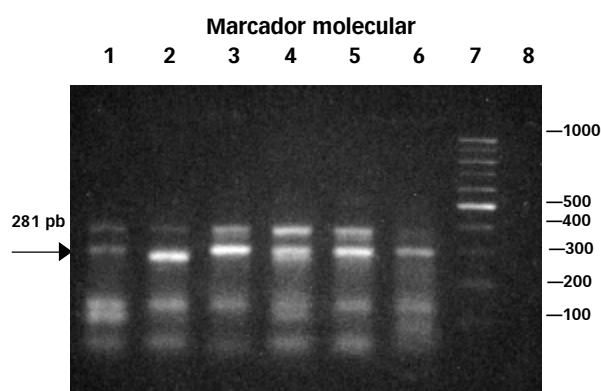


FIGURA 3: RT-PCR para FA con material extraído a partir de lotes de mosquitos capturados a campo y controles. Calle 1: muestra de 5 cabezas de mosquitos negativa. Calle 2: muestra de 5 cabezas negativas mas $4,8 \times 10^3$ PFU de 17D (aprox. $4,3 \times 10^3$ PFU en reacción). Calle 3 a 6: muestras de mosquitos de campo, con 2, 4, 2 y 9 cabezas respectivamente. Calle 7: marcador de 100 pb. Calle 8: control negativo, agua como blanco.

Sensibilidad de la técnica

Se determinó la sensibilidad del método mediante un ensayo de diluciones de ARN viral en homogenado de 5

cabezas de mosquito. Se logró detectar hasta $4,8 \times 10^2$ PFU 17D/reacción, significando esto $2,1 \times 10^4$ PFU/ml de control de 17 D (Figura 4). Esta sensibilidad es semejante a la lograda por Lanciotti [23] en un ensayo análogo de detección en mosquitos del flavivirus West Nile, donde se aplicó extracción de ARN con un kit comercial y RT-PCR clásica, y se reporta una sensibilidad mayor a 10^2 PFU/reacción.

Teniendo en cuenta que los niveles de viremia de FA (cepa Asibi), en infecciones experimentales a monos del género *Cynomolgus*, se ubicaron entre $10^{7,5}$ y $10^{4,7}$ PFU/ml [12], y que los títulos virales de lotes de *A. aegypti* infectados con el flavivirus Dengue 2 se encontrarían entre 10^3 y 10^5 PFU/ml [24], la sensibilidad del protocolo presentado en este trabajo resultaría satisfactoria.

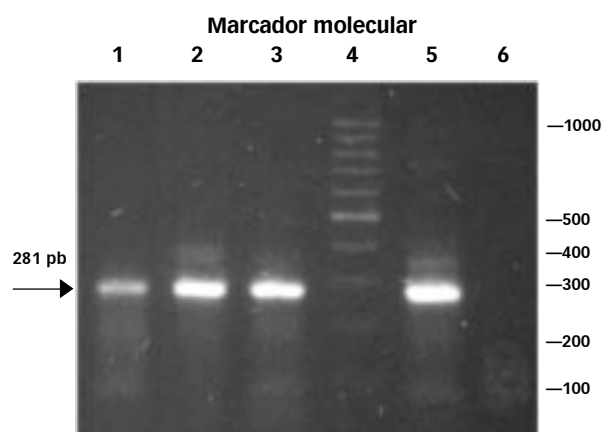


FIGURA 4: sensibilidad del método de RT-PCR para FA en muestras de cinco cabezas de mosquitos *A. aegypti*. Calle 1: $4,8 \times 10^2$ PFU de 17D. Calle 2: $4,8 \times 10^3$ PFU de 17D. Calle 3: $4,8 \times 10^4$ PFU de 17D. Calle 4: marcador de peso molecular 100 pb. Calle 5: control de ARN viral puro, $4,8 \times 10^4$ PFU de 17D. Calle 6: control negativo, agua como blanco.

CONCLUSIONES

Se propuso y se demostró la efectividad de un protocolo optimizado para la detección del genoma de FA en muestras de mosquitos *A. aegypti* por RT-PCR *semi-nested*. El mismo admitió un máximo de 15 cabezas de mosquitos, sin presentarse inhibición de amplificación y exhibió sensibilidad adecuada para el tipo de espécimen. La purificación del ARN viral de las muestras de insectos aplicando un paso de extracción orgánica ácida fue imprescindible, ya que permitió mejorar la calidad de la amplificación reduciéndose sustancialmente los productos inespecíficos.

De esta manera se contaría con una herramienta de monitoreo virológico temprano para mosquitos de campo infectados con un arbovirus patógeno para el hombre. Esto facilitaría el desarrollo estructurado de estrategias para la vigilancia de la circulación viral y control de bro-

tes, aportando concretamente a la prevención de la transmisión y enfermedad en humanos.

Es de esperar que este mismo protocolo se desempeñe satisfactoriamente con otras especies de mosquitos, como ser los vectores selváticos de la Fiebre Amarilla (*Haemagogus* sp. y *Sabethes* sp.). ●

REFERENCIAS

1. Gerlich, W. *Introduction to this Special Issue on Flaviviridae*, Clin. Diag. Virol. 10: p. 91-95. 1998.
2. Woodring, J. L.; Higgs, S.; Beaty, B. J. *The Biology of Disease Vectors*. Beaty B. J. & Marquardt W. C. Editor. University Press of Colorado. p. 51-72. 1996.
3. Vainio, J.; Cutts, F. *Yellow Fever*. WHO, Geneva. 1998.
4. Monath, T. P. *The Arboviruses: Epidemiology and Ecology*, CRC Press, Boca Raton, USA, (I). 1988.
5. Gubler, D. J. *Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever*, Clin. Microbiol. Rev. 11: p480-496. 1998.
6. Van der Stuff, P.; Gianella, A.; Pirard, M.; Cespedes, J.; Lora, J.; Peredo, J. L.; Vorndam, V.; Boeleaert, M. *Urbanization of Yellow Fever in Santa Cruz, Bolivia*, The Lancet, 353 (8): p. 1558-1562. 1999.
7. Carballal, G.; Oubina, J. R., *Virología Médica*. El Ateneo, Buenos Aires, 2 ed. 1999.
8. Chow, V.; Chan, Y.; Yong, R.; Lee, M.; Lim, L.; Chung, Y.; Lam-Phua, S.; Tan, B. *Monitoring of Dengue Viruses in Field Caught Aedes aegypti and Aedes albopictus Mosquitoes by a Type-Specific Polymerase Chain Reaction and Cycle Sequencing*. Am. J. Trop. Med. Hyg, 58(5), p: 578-586. 1998.
9. Lanciotti, R. S.; Calisher, C. H.; Gubler, D. J.; Chang, G. J.; Vorndam, V. *Rapid Detection and Typing of Dengue Viruses from Clinical Samples by Using Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction*, J. Clin. Virol. 30, p: 545-551. 1992.
10. Chang, G. J.; Trent, W. D.; Vorndam, A. V.; Vergne, E.; Kinney, R. M.; Mitchell, C. J. *An Integrated Target Sequence and Signal Amplification Assay, Reverse Transcriptase-PCR-Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay, to Detect and Characterize Flavivirus*, J Clin Microb. 32 (2): p. 477-483. 1994.
11. Chunge, E.; Roche, C.; Lefevre, M. F.; Barbazan, P.; Chanteau, S. *Ultra-Rapid, Simple, Sensitive, and Economical Silica Method for Extraction and Detection of Dengue Viral RNA from Clinical Specimens and Mosquitoes by Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction*, J. Med. Virol. 40: p. 142-145. 1993.

12. **Brown, T. M.; Chang, G.-J.; Cropp, C. B.; Robbins, K. E.; Tsai, T. F.** *Detection of Yellow Fever Virus by Polymerase Chain Reaction*, Clin. Diagn. Virology. 2: p. 41-51. 1994.
13. **Deubel, V.; Huerre, M.; Cathomas, G.; Drouet, M. T.; Le Guenno, W. B.; Widmer, A.** *Molecular Detection and Characterization of Yellow Fever Virus in Blood and Liver Specimens of a Non-Vaccinated Fatal Human Case*, J. Med. Virol. 53: p. 212-217. 1997.
14. **Kuno, G.** *Universal Diagnostic RT-PCR Protocol for Arboviruses*, J. Virol. Methods. 72: p. 27-41. 1998.
15. **Tanaka, M.** *Rapid Identification of Flavivirus Using the Polymerase Chain Reaction*, J Virol Methodos. 41: p. 311-322. 1993.
16. **White, D. J.; Kramer, L. D.; Backenson, B.; Lukacik, G.; Johnson, G.; Oliver, J.; Howard, J. G.; Means, R. G.; Eidson, M.; Gotham, I.; Kulasekera, V.; Campbell, S.** *Mosquito surveillance and polymerase chain reaction detection of West Nile Virus, New York State*. Emerging Infectious Diseases. 7 (4): p. 643-649. 2001.
17. **Reinhardt, B.; Jaspert, R.; Niedrig, M.; Kostner, C.; L'age-Stein, J.** *Development of Viremia and Humoral and Cellular Parameters of Immune Activation After Vaccination with Yellow Fever Virus Strain 17D: A Model of Human Flavivirus Infection*, J Med Virol. 56: p. 159-167. 1998.
18. **Rosen, L.** *On the Mechanism of Vertical Transmission of Dengue Virus in Mosquitoes*, C.R. Acad. Sc. Paris. t. 304, Serie III, n 13, p. 347-350. 1987.
19. **Boom, R.; Sol, C. J. A.; Salimans, M. M.; Jansen, C. L.; Wertheim van Dillen, P. M. E.; Van der Nordaa, J.** *Rapid and Simple Method for Purification of Nucleic Acids*, J. Clin. Microbiol. 28: p. 495-503. 1990.
20. **Harris, E.; Roberts, T. G.; Smith, L.; Selle, J.; Kramer, L. D.; Valle, S.; Sandoval, E.; Balmaseda, A.** *Typing of Dengue Viruses in Clinical Specimens and Mosquitoes by Single-Tube Multiplex Reverse Transcriptase PCR*, J Clin Microbiol. 36 (9), p. 2634-2639. 1998.
21. **Chomczynski and Sacchi.** *Single-Step Method of RNA Isolation by Acid Guanidium Thiocyanate Phenol-Chloroform Extraction*, Anal. Chem. 162: p. 156-159. 1987.
22. **Liotta, D. J.; Cabanne, G. S.; Tonon, S. A.** *Extracción, Purificación y Detección Molecular del Genoma del Dengue Tipo 2 en Mosquitos Aedes aegypti*, Rev. Ciencia y Tecnología, CIDEt, 3, p. 47-52. 2000.
23. **Lanciotti, R. A.; Kerst, A. M.; Nasci, R. S.; Godsey, M. S.; Mitchell, C. J.; Savage, H. M.; Komar, N.; Panella, N. A.; Allen, B. C.; Volpe, K. E.; Davis, B. S.** *Rapid detection of West Nile Virus from human clinical specimens, field-collected mosquitoes, and avian samples by a TaqMan reverse transcriptase-PCR assay*. J Clinical Microbiology, Nov, p. 4066-4071. 2000.
24. **Thu, H. M.; Mar Aye, K.; Thein, S.** *The Effect of Temperature and Humidity on Dengue Virus Propagation in Aedes aegypti Mosquitos*. Southeast Asian J Trop Med Public Health. 29 (2), p. 280-284. 1998.