

UNIVERSIDAD NACIONAL
SISTEMA DE ESTUDIOS DE POSGRADO
POSGRADO REGIONAL EN CIENCIAS VETERINARIAS TROPICALES



**Presencia de los virus dengue, chikungunya y Zika y los haplotipos de larvas de
Aedes albopictus en Costa Rica**

Universidad Nacional, Heredia

**Tesis sometida a consideración del Tribunal Examinador del Posgrado Regional
en Ciencias Veterinarias Tropicales, Maestría en Enfermedades Tropicales para
optar al grado de *Magister Scientiae***

**Presencia de los virus dengue, chikungunya y Zika y los haplotipos de larvas de
Aedes albopictus, en Costa Rica**

Edwin Beltré Núñez

**Tesis sometida a consideración del Tribunal Examinador del Posgrado Regional
en Ciencias Veterinarias Tropicales, Maestría en Enfermedades Tropicales para
optar al grado de *Magister Scientiae***

MIEMBROS DEL TRIBUNAL EXAMINADOR

[M.Sc. Randall Gutiérrez Vargas /Dra. Damaris Castro García /Dr. Jorge Herrera Murillo/ Dr. José Vega Baudrit /Dr. Greivin Rodríguez Calderón/ Dra. Rocío Castillo Cedeño]

Representante del Consejo Central de Posgrado

M.Sc. Sandra Estrada Köning
Coordinador del posgrado o su representante

PhD. Gaby Dolz Wiedner
Tutor de tesis

PhD. Ana Jiménez Rocha
Miembro del Comité Asesor

M.Sc. Silvia Argüello Vargas
Miembro del Comité Asesor

Lic. Edwin Beltré Núñez
Sustentante

RESUMEN GENERAL

Las enfermedades ocasionadas por el virus de dengue (DENV), Zika virus (ZIKV) y virus de chikungunya (CHIKV) son transmitidas, entre otros, por *Aedes albopictus* en forma horizontal a los humanos, a través de la picadura de un mosquito hembra infectado; sin embargo, la hembra puede pasar el virus de manera vertical o transovárica a sus descendientes, permitiendo así a estos arbovirus persistir en periodos interepidémicos en huevos y larvas. Datos del 2020 reportaron 9400 casos DENV, 49 casos CHIKV y 121 casos ZIKV, mostrando que estos arbovirus representan un problema importante para la salud pública de Costa Rica. Las estrategias de control de estos vectores incluyen la aplicación de insecticidas y la eliminación de los criaderos, sin embargo, estudios de variación genética de las especies de *Aedes* brindan información sobre dispersión y dinámica poblacional, lo que puede ser utilizado para diseñar estrategias de control de estos vectores. El objetivo del presente trabajo fue en una primera parte determinar los índices de diversidad de culícidos y detectar la presencia de DENV, CHIKV y ZIKV en larvas de *Ae. albopictus*, para determinar dominancias de especies y evidenciar la transmisión transovárica de estos virus en Costa Rica, y en una segunda parte, investigar la diversidad de haplotipos de *Ae. albopictus* en diferentes distritos de Costa Rica. Se recolectaron larvas de mosquitos en 26 localidades de 19 distritos durante la época lluviosa de Costa Rica, los cuales se identificaron a nivel de especie (*Aedes* y *Culex*) o género (*Limatus*) y se calcularon diversos índices de diversidad. Una larva de *Ae. albopictus* por distrito se sometió a extracción de ADN y análisis moleculares para determinar el haplotipo, mientras que las larvas restantes de *Ae. albopictus* se sometieron a análisis molecular para detectar la presencia de DENV, ZIKV y CHIKV. En total se recolectaron 5036 larvas de 8 especies distintas, *Aedes aegypti* resultó ser la especie más abundante (n=3188 63%), seguida de *Ae. albopictus* (n=701, 14%). Se reporta por primera vez la presencia de larvas de *Ae. albopictus* (n=105) en la localidad de Punta Morales. Guácimo y La Virgen fueron los distritos con mayor riqueza de culícidos, encontrándose un total de seis especies, mientras que en Jacó, La Suiza y Pital únicamente se encontró *Ae. aegypti*. Pavones fue el distrito con mayor equitatividad y Siquirres con menor equitatividad de diversidad y abundancia. Los grupos de larvas de *Ae. albopictus*

(n=23) resultaron negativos a DENV, CHIKV y ZIKV en reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa en tiempo real (qRT-PCR)

Aedes albopictus se encontró en 11 de 19 distritos muestreados. Se determinó cinco variantes genéticas, los haplotipos H3, H6, H26, H37 y H67, la presencia de tres haplotipos (H3, H6 y H26) se reporta por primera vez en Costa Rica. Estos haplotipos se encontraron cada uno solamente en un distrito, mientras que los otros dos haplotipos (H37 y H67), ya reportados previamente, se encontraron en diferentes distritos. El haplotipo más abundante fue el H67, que se encontró en cinco distritos, seguido del H37 que se encontró en tres distritos. Los haplotipos presentaron entre tres (n=1) y seis (n=5) sitios polimórficos, dos de los sitios polimórficos (40 y 94) afectan la secuencia de los aminoácidos. El árbol filogenético estableció cinco clados bien definidos. Los haplotipos encontrados, presentaron una estrecha relación entre sí, observándose una diferencia moderada entre los haplotipos reportados anteriormente (H67 y H37) y los nuevos haplotipos (H3 y H26) y una diferencia significativa entre los haplotipos reportados anteriormente y el haplotipo 6. Se recomienda realizar estudios sistemáticos de haplotipos de *Ae. albopictus* con un mayor número de muestras por distrito o localidad y en diferentes estaciones climáticas e investigar si los haplotipos más abundantes son resistentes a insecticidas o si presentan una transmisión transovárica más efectiva.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Gaby Dolz por su apoyo y tutoría durante todo este proceso.

A mis asesoras, Dra. Ana Jiménez Rocha y M.Sc. Silvia Argüello Vargas, por todas sus recomendaciones.

Al Servicio Alemán de Intercambio Académico (DAAD) por el apoyo con la beca.

A los integrantes del Laboratorio de Zoonosis M.Sc Antony Solórzano y Sergio Alfaro por su ayuda en el laboratorio.

A la Dirección de Vigilancia de Vectores del Ministerio de Salud; especialmente a la M.Sc Gabriela Delgado, M.Sc Carlos Aguilar y Manuel Gutiérrez por su apoyo incondicional en la recolección y clasificación de las muestras.

DEDICATORIA

A Dios Por escucharme noche tras noche, porque sin el nada en esta vida es posible, por darme salud, fuerza, felicidad y esperanza día tras día.

A mis padres. Por creer en mí y apoyarme en todos los sentidos para cumplir este sueño.

A mi esposo que siempre es mi timón, que me guía día tras día para que no pierda las ganas de luchar ni la fe en mí.

A mi tía, mis hermanos y mis amigos que siempre están ahí de manera incondicional.

ÍNDICE

RESUMEN GENERAL	iv
AGRADECIMIENTOS	vi
DEDICATORIA	vii
ÍNDICE DE CUADROS	x
ÍNDICE DE FIGURAS	xi
INTRODUCCIÓN GENERAL	xii
Importancia y distribución <i>Aedes albopictus</i>	xii
Taxonomía y ciclo de vida	xiii
Morfología de <i>Aedes albopictus</i>	xiii
Hábitos, hábitat y criaderos	xvi
Transmisión de virus por mosquitos <i>Aedes</i> y rol epidemiológico de las larvas	xvi
Índices de diversidad	xvii
Virus Dengue	xviii
Virus Chikungunya	xix
Virus Zika	xix
Control de vectores y haplotipos	xx
Referencias bibliográficas	xxi
ARTÍCULO I	1
Resumen	1
Abstract	2
1. Introducción	3
2. Materiales y Métodos	5
2.1 Tipo de estudio y muestra	5
2.2 Identificación de las larvas	5
2.3 Índices de diversidad	6
2.4 Análisis molecular	7
3. Resultados	9
4. Discusión	16
5. Conclusiones	18
6. Recomendaciones	18
7. Referencias bibliográficas	19
ARTÍCULO II	24
Resumen	24

Abstract.....	25
1. Introducción.....	25
2. Materiales y Método.....	28
2.1 Tipo de estudio y muestra	28
2.2 Identificación de las larvas.....	28
2.3 Extracción de ADN	28
2.4 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	29
2.5 Secuenciación y análisis de haplotipos	29
2.6 Recolecta de datos y mapa	29
3. Resultados.....	30
4. Discusión	34
5. Conclusiones	35
6. Recomendaciones	36
7. Referencias bibliográficas	36
Discusión general.....	41
Conclusiones generales.....	44
Recomendaciones generales	44

ÍNDICE DE CUADROS

ARTÍCULO I

Cuadro 1.	8
Sondas y cebadores utilizados en qRT-PCR para detectar los virus dengue, chikungunya, y Zika en larvas de <i>Ae. albopictus</i> de Costa Rica.	
Cuadro 2.	10
Índice de riqueza de especies en los 19 distritos de Costa Rica, 2021.	
Cuadro 3.	11
Grado de similitud y diferencias en comparación con presencia y ausencia de todas las especies encontradas (Índice de Jaccard) en 19 distritos de Costa Rica, 2021.	
Cuadro 4.	12
Riqueza específica (S), índice de Shannon-Weaver (H), índice de Margalef (DMg) e índice de Pielou (J) de todas las especies encontradas en los 19 distritos de Costa Rica, 2021.	
Cuadro 5.	13
Cantidad de larvas <i>Ae. albopictus</i> encontradas y número de grupos analizados mediante RT-qPCR para DENV, ZIKV y CHIKV en 11 distritos de Costa Rica.	

ARTÍCULO II

Cuadro 1.	30
Coordenadas geográficas de los 11 distritos con larvas <i>Ae. albopictus</i> que se sometieron al análisis de haplotipos en Costa Rica, 2021.	
Cuadro 2.	31
Haplotipos de larvas <i>Ae. albopictus</i> encontrados en diferentes distritos de Costa Rica, código de acceso y países con reportes de los haplotipos del gen COI de <i>Ae. albopictus</i> encontrados en Costa Rica.	
Cuadro 3.	32
Sitios polimórficos de los cinco haplotipos (H3, H6, H26, H37 y H67) de larvas <i>Ae. albopictus</i> de Costa Rica, encontrados en las secuencias del gen COI.	

Cuadro 4.	32
Sitios de cambios de aminoácidos de los cinco haplotipos (H3, H6, H26, H37 y H67) de larvas <i>Ae. albopictus</i> de Costa Rica, encontrados en las secuencias del gen COI.	

ÍNDICE DE FIGURAS

ARTÍCULO I

Figura 1.	14
Resultados de los 23 grupos de larvas analizados por RT-qPCR para detección de DENV.	

Figura 2.	15
Resultados de los 23 grupos de larvas analizados por RT-qPCR para detección de CHIKV.	

Figura 3.	16
Resultados de los 23 grupos de larvas analizados por RT-qPCR para detección de ZIKV.	

ARTÍCULO II

Figura 1.	33
Mapa de distribución de los haplotipos del gen COI de <i>Ae. albopictus</i> encontrados en Costa Rica.	

Figura 2.	34
Árbol filogenético de los haplotipos de <i>Ae. albopictus</i> encontrados en Costa Rica, basados en la secuencia del gen COI.	

INTRODUCCIÓN GENERAL

Importancia y distribución *Aedes albopictus*

En la última década se ha reconocido al mosquito *Aedes albopictus* como vector biológico competente para más de 26 virus, entre estos el virus del dengue (DENV), virus de la fiebre amarilla (YFV), virus de la fiebre chikungunya (CHIKV), y el virus Zika (ZIKV) (McKenzie et al., 2019). Aunque *Aedes aegypti* se considera el principal vector involucrado en la transmisión del DENV, CHIKV y ZIKV, *Ae. albopictus* desempeña un papel cada vez más importante como vector de arbovirus, debido a su amplia distribución, y a que puede adaptarse fácilmente a nuevos entornos, sobre todo a regiones templadas y zonas tropicales como Costa Rica (Kyle & Harris, 2008; Rey & Lounibos, 2015).

La incursión de *Ae. albopictus* en América ocurrió en las últimas tres décadas (Rey & Lounibos, 2015), su rango de distribución se extiende más al norte que *Ae. aegypti* (Figura 1), ya que sus huevos son resistentes a temperaturas bajo cero (Kyle & Harris, 2008). En Costa Rica se ha encontrado *Ae. albopictus* en todas las provincias, menos en Cartago (Rojas-Araya et al., 2017). La presencia de *Ae. albopictus* en Puntarenas y Liberia ha coincidido con la notificación de casos de dengue, chikungunya y Zika reportados en estas provincias en el 2016 (Ministerio de Salud de Costa Rica, 2017).

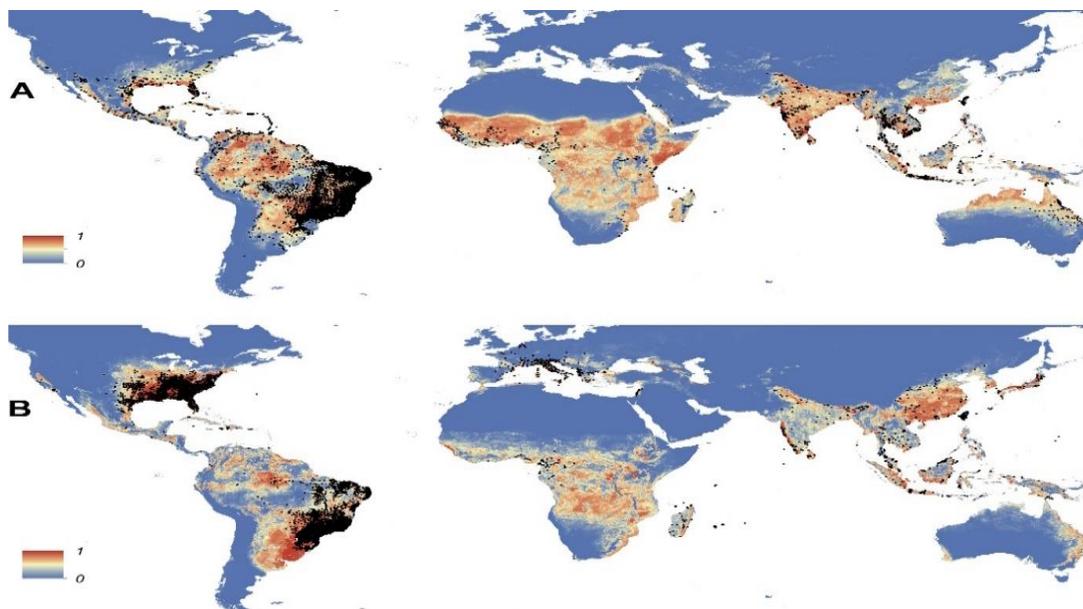


Figura 1. Distribución de *Ae. aegypti* (A) y *Ae. albopictus* (B). El mapa muestra con puntos negros donde se ha encontrado cada especie y la probabilidad de ocurrencia (de 0 azul a 1 rojo) con una resolución espacial de 5 km x 5 km. (Kraemer et al., 2015).

Taxonomía y ciclo de vida

Aedes albopictus es un insecto holometabólico, lo que significa que pasa por metamorfosis completa. El ciclo de vida consta de dos fases: la fase acuática (larvas y pupas) y la fase terrestre (huevos y adultos) y puede tardar entre 8 a 10 días, dependiendo de las condiciones ambientales y el alimento disponible (Khetarpal & Khanna, 2016). Del huevecillo emerge una larva de primer estadio (L1) que madura pasando por tres estadios larvales más (L2, L3 y L4). En condiciones óptimas el periodo entre eclosión y pupación puede ser tan corto como de 5 días, pero generalmente dura entre 7 a 14 días. Los primeros tres estadios se desarrollan rápidamente, mientras que el cuarto estadio puede tomar más tiempo y es cuando la larva incrementa de tamaño y peso. En el agua, las larvas se alimentan de protozoos, bacterias, levaduras y algas. Las pupas permanecen flotando en la superficie del agua, de las cuales emerge el adulto 1-3 días después, dependiendo de las condiciones ambientales (Hernández & García, 2000; Nelson, 1986). La vida del adulto varía de 2 a 4 semanas. Un mosquito hembra pone huevos 4 a 5 veces durante toda su vida y se alimenta de sangre dependiendo de la cantidad de posturas durante su vida. El número promedio de huevos en un solo desove oscila entre 10 y 100 huevos (Zahoor et al., 2019). La hembra de *Ae. albopictus* suele colocar los huevos en criaderos naturales como agujeros de árboles, troncos de bambú, rocas huecas, axilas de plantas, cáscaras de coco y hojas (Khetarpal & Khanna, 2016).

Morfología de *Aedes albopictus*

Los huevos son largos, lisos y ovoides, aproximadamente 1 mm de largo, y de color blanco cuando están recién colocados, volviéndose negros dos horas después de la oviposición, como resultado de la melanización. Son resistentes a la desecación, permaneciendo viables durante un periodo aproximado de 1 año, hasta tener contacto con el agua (Khetarpal & Khanna, 2016; Powell & Tabachnick, 2013).

Las larvas tienen cabeza, tórax y abdomen ovoide. En el primer estadio la larva mide alrededor de 1 mm de largo, al llegar al cuarto estadio esta puede llegar a alcanzar una longitud de 8 mm aproximadamente. Las características más distintivas de las larvas de *Ae. albopictus* son las 2 espinas laterales a cada lado del tórax de un menor tamaño que otras especies del género, y en el octavo segmento presenta un peine (Figura 2a) de 8 a 12 espinas mediales robustas con ausencia de espinas subapicales (Figura 2b). Entre el último estadio larval y la etapa adulta del mosquito se encuentra la pupa. Las pupas presentan una forma particular de coma. Están compuesta de dos secciones principales: cefalotórax y abdomen (Nelson, 1986; Rueda 2004).

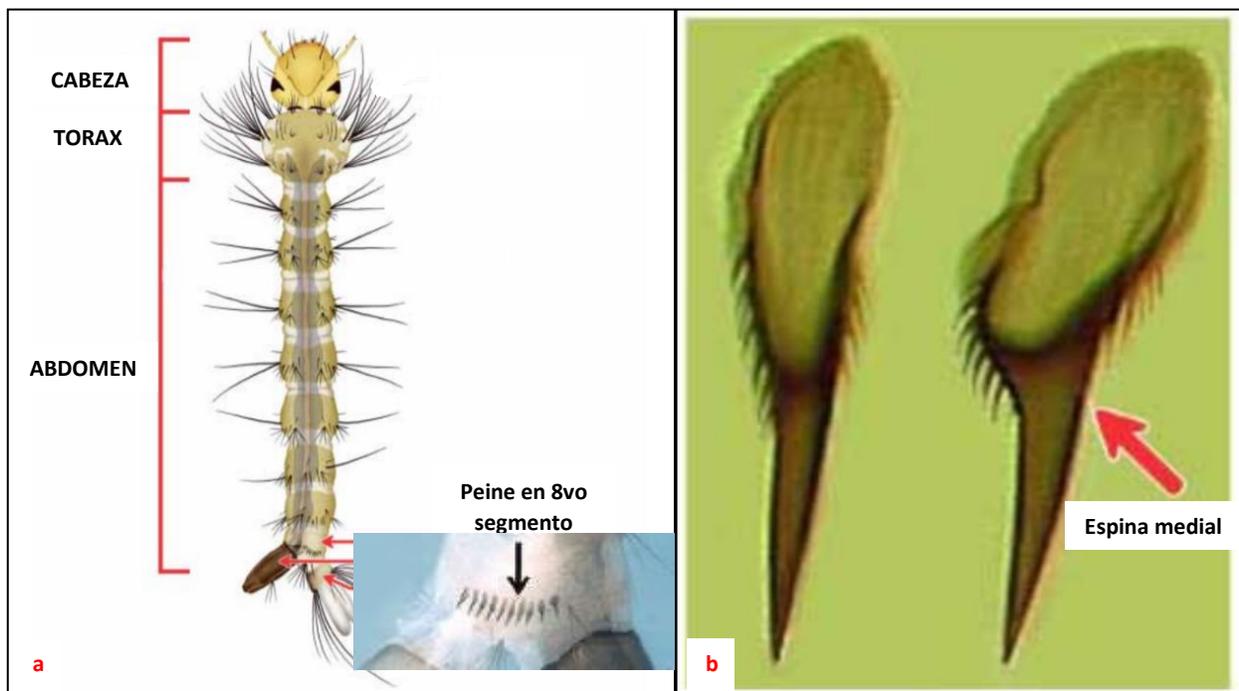


Figura 2. A. Vista dorsal de una larva *Aedes albopictus*. **B.** Espina medial robusta sin espinas subapicales en el octavo segmento (Rueda, 2004).

El mosquito adulto está compuesto por tres segmentos: cabeza, tórax y abdomen. El macho y la hembra son muy similares en apariencia excepto por algunas diferencias como el tamaño, la forma de las antenas, palpos maxilares, abdomen, garras y en las marcas de las escamas (Bar & Andrew, 2013; OECD, 2018).

El mosquito adulto de *Ae. albopictus* a nivel del tórax presenta longitudinalmente un escudo con una estrecha franja blanca mediana (Figura 3a), en el mesoepimerón presenta una mancha escamosa blanca no separada, formando una mancha blanca en forma de V (Figura 3b), en la cabeza presentan un cípeo sin escamas blancas (Figura 3c) y en la porción anterior de las patas no presentan raya blanca longitudinalmente (Figura 3d) (Rueda, 2004).

A nivel de la cabeza tanto el macho como la hembra, presentan dorsalmente una forma globular y lateralmente tienen una forma convexa, con un vértice que tiene escamas. El tórax de la hembra mide entre 0,08 y 0,50 mm de largo y de 0,07 a 0,35 mm de ancho, mientras que el macho, mide entre 0,06 y 0,41 mm de largo y 0,02 a 0,29 mm de ancho. En la hembra el octavo segmento es más reducido que en los machos. El abdomen de los machos es de mayor tamaño que el de las hembras, en el macho mide entre 0,18 – 3,03 mm de largo y 0,07 – 0,51 mm de ancho, mientras que en las hembras mide entre 0,20 – 2,94 mm de largo y 0,06 – 0,41 mm de ancho. (Andrew & Bar, 2013; Rueda, 2004).

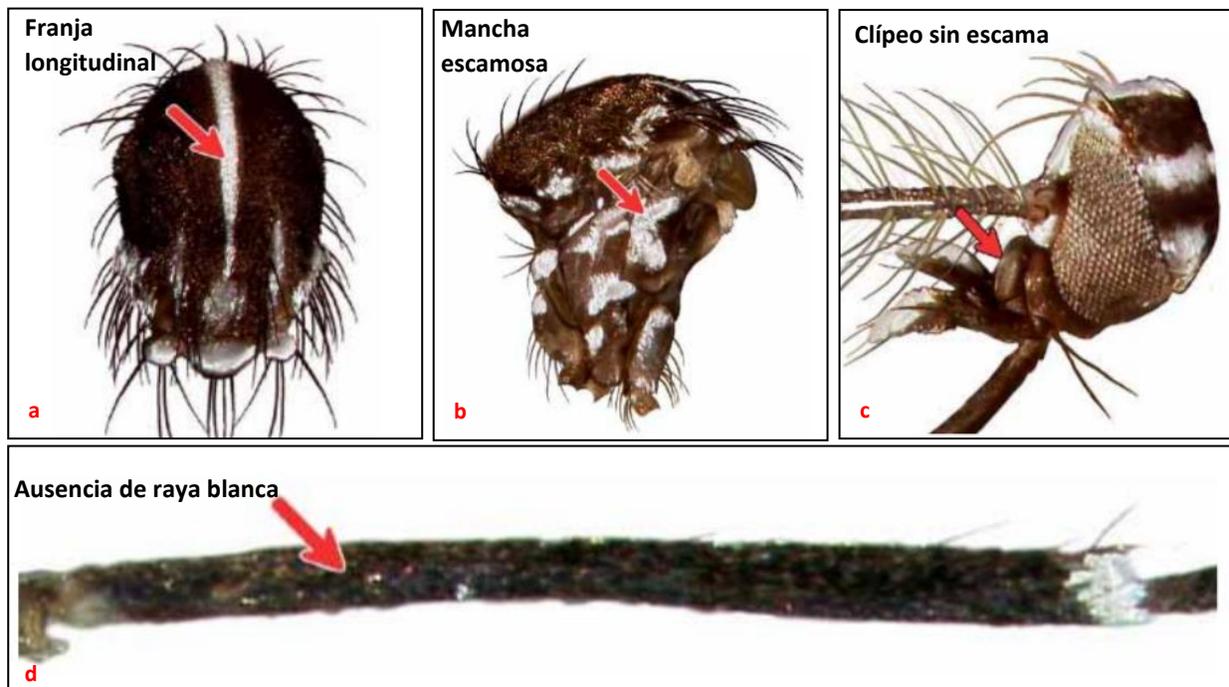


Figura 3. Morfología de un mosquito *Ae. albopictus*. **A.** Franja longitudinal en tórax. **B.** Mesepimerón con mancha escamosa blanca no separada en forma de V. **C.** Cípeo de

la cabeza sin escamas blancas **D.** Patas con ausencia de raya blanca longitudinalmente (Rueda, 2004).

Hábitos, hábitat y criaderos

Ae. albopictus presenta hábitos más selváticos que *Ae. aegypti*, pero ha podido adaptarse y ha ido incrementando su presencia en ambientes más urbanos (Kraemer et al., 2015). Los machos y las hembras muestran una actividad predominantemente diurna, con picos agudos después del amanecer y antes del atardecer. Sus patrones de aterrizaje están relacionados con factores ambientales como la iluminación. La actividad de oviposición se intensifica durante la temporada de lluvias debido al aumento en la disponibilidad de criaderos y abundancia de población de mosquitos (Casas et al., 2013; OECD, 2018). Normalmente el mosquito adulto de *Aedes* viaja distancias relativamente cortas, unos 100m, aunque se han observado viajes más largas de alrededor de 800m (Hemme et al., 2010). Los hábitos hematófagos de la hembra aumentan durante el ciclo gonotrófico, que consiste en la absorción de sangre, seguido de la digestión, maduración de los oocitos y la oviposición (Zapletal et al., 2019). *Ae. albopictus* se puede encontrar con mayor frecuencia en zonas rurales y periurbanas, alimentándose de mamíferos salvajes, aves y ocasionalmente de humanos. Para la reproducción y los criaderos buscan lugares protegidos de la intensa luz solar, acumulación de calor y que proporcionen una fuente de detritos y bacterias para el consumo de las larvas (Kraemer et al., 2015).

Transmisión de virus por mosquitos *Aedes* y rol epidemiológico de las larvas

Los virus dengue, chikungunya y Zika se transmiten a los humanos a través de la picadura de un mosquito hembra del género *Aedes*, el cual se infectó al ingerir sangre de un huésped virémico. Cuando los virus son ingeridos por el mosquito, infectan el epitelio del intestino medio del mosquito, posteriormente se diseminan a través de la hemolinfa a otros órganos, infectando finalmente las glándulas salivales. El virus se secreta en la saliva del mosquito y de este modo al alimentarse del huésped humano se produce la infección. El virus permanecerá en el mosquito y se transmitirá a través de las picaduras durante toda su vida, este mecanismo es conocido como transmisión horizontal (Sim & Hibberd, 2016).

Existe evidencia, tanto de campo como de laboratorio, de transmisión transovárica o trans-huevo y venérea de DENV, CHIKV y ZIKV, por infección de tejidos germinales (Ferreira & Lima, 2018; Gutiérrez et al., 2019; Thangamani et al., 2016). La combinación de la transmisión transovárica y horizontal permite que los patógenos persistan en periodos interepidémicos en huevos y larvas. En estudios realizados en Cuba se logró aislar el virus del dengue en 37 de 111 grupos de larvas que contenían los cuatro estadíos de *Aedes* (Gutiérrez et al., 2018). En Tailandia se logró aislar el virus chikunhunya en 54 de 180 grupos de larvas de *Aedes* del cuarto estadío (Chompoonsri et al., 2016), mientras que estudios realizados en Brasil aislaron el virus de Zika en 3 de 18 grupos de larvas con los cuatro estadíos de *Aedes* (Maniero et al., 2019). Estos estudios confirman la importancia de las larvas en la circulación y transmisión de estos virus. Se ha observado que la transmisión transovárica del virus del dengue es significativamente mayor en *Ae. albopictus* que en *Ae. aegypti*, sobre todo DENV1 y DENV4 muestran una tasa de transmisión transovárica significativamente más alta que DENV2 y DENV3 (Lequime et al., 2016).

Índices de diversidad

Las herramientas utilizadas para expresar cuantitativamente la biodiversidad y riqueza de especies de artrópodos en un área, son los índices de diversidad, que determinan la variedad y heterogeneidad de diversas especies (Morris et al., 2014), para establecer especies endémicas y exóticas, analizar cambios en la diversidad y determinar las similitudes o dominancias de las especies estudiadas en un periodo determinado, todo con la finalidad de estudiar factores como la existencia de competencia vectorial y cambios de comportamiento según las condiciones del lugar. Estos índices se utilizan para caracterizar una región y asociar la diversidad a factores socioambientales que son fundamentales para comprender los factores relacionados con la transmisión de arbovirus, con el fin de determinar los ambientes y las estaciones adecuadas en donde se debe planificar y realizar el control de vectores (Confalonieri & Costa, 2012; Torres et al., 2020), ya que los índices indican el tamaño de la población en diferentes estaciones y ayudan con el seguimiento de las poblaciones (Boyer et al., 2014)

Se utilizan varios índices, que miden diferentes variables, siendo los más utilizados los índices de Jaccard Shannon–Weaver, Margalef y Pielou. El índice de Jaccard mide el grado de similitud y diferencias en comparación con presencia y ausencia de especies encontradas (Leydesdorff, 2008), mientras que el índice de Shannon–Weaver analiza la diversidad combinando la riqueza específica y la equitatividad de los culícidos encontrados. Mide el grado para predecir a que especie pertenecerá un individuo escogido al azar en una colección, asumiendo que todas las especies están representadas en la muestra. El índice de Margalef corresponde a un indicador de la riqueza específica donde se transforman el número de especies encontradas en proporciones, mientras que el indicador de Pielou permite determinar si la abundancia de diferentes especies de individuos es semejante (Moreno, 2000).

Virus Dengue

El virus del dengue pertenece al género *Flavivirus*, familia *Flaviviridae*, reino *Orthornavirae* y dominio *Ribovira*. La partícula viral es de forma esférica, de 40-60nm de diámetro, envuelta, y el genoma comprende una cadena simple de ARN monocatenaria positiva que codifica diez proteínas (tres proteínas estructurales y siete proteínas no estructurales) (Khetarpal & Khanna, 2016). Se conocen cuatro serotipos (DENV1 a DENV4), estrechamente relacionados, pero antigénicamente distintos (Guo et al., 2016). Cada uno de los serotipos puede subdividirse en varios genotipos basados en el gen de la envoltura (Cao et al., 2019). El mecanismo que permite que DENV permanezca en un ambiente durante los períodos interepidémicos es su transmisión transovárica, de un mosquito hembra a su progenie (Adams & Boots, 2010). La presencia del DENV2 en América se ha asociado con epidemias de dengue grave. (Galán, 2013).

Aproximadamente dos quintas partes de la población mundial está en riesgo de contraer una infección por dengue y se estima que anualmente 500.000 personas se ven afectadas por la fase hemorrágica de la enfermedad con tasas de mortalidad que llegan a superar el 20%. El dengue está ampliamente distribuido en los trópicos (Hemme et al., 2010). En Costa Rica desde la reintroducción de *Ae. aegypti* en 1993 hasta 2020 las regiones más afectadas por dengue han sido la región Pacífico Central,

la Chorotega y la Huetar Atlántica (Ministerio de Salud, 2020). En el 2013 Costa Rica presentó su peor epidemia de dengue, con una elevada incidencia de casos (Ledezma et al., 2018). La incidencia de dengue para el año 2019 fue de 189,78 casos por cada 100.000 habitantes con una circulación del serotipos 1 y 2 (OPS, 2020).

Virus Chikungunya

El virus chikungunya (CHIKV), pertenece al género Alphavirus, familia Togaviridae, reino Orthornavirae y dominio Ribovira. Es un virus envuelto de 45 a 70 nm que tiene un genoma de ARN de sentido positivo monocatenario de 11,8 kB que codifica nueve proteínas (cinco proteínas estructurales y cuatro proteínas no estructurales) (DeZure & Graham, 2016). Se reconoce la existencia de 2 ciclos de transmisión, el selvático/enzoótico (entre *Aedes* spp. y primates no humanos) y el urbano/endémico (entre *Ae. aegypti*, *Ae. albopictus* y humanos) (Martínez & Torrado 2015).

Se han descrito la transmisión vectorial (transovárica o transestadial) y otros modos de transmisión, como la transplacentaria y perinatal. Este virus puede ocasionar meningoencefalitis, lesiones de sustancia blanca, edema cerebral, hemorragia intracraneana, síntomas hemorrágicos y miocarditis (Arredondo et al., 2016; Martínez & Torrado 2015).

El CHIKV se reportó por primera vez en Tanzania en 1952, donde infectó a primates y humanos. En 2013 apareció en las Américas y en 7 meses, se reportaron más de 400.000 casos en más de 20 países del Caribe y de América Central y del Sur. Recientemente se demostró transmisión por *Ae. albopictus* (Bonthius & Bale, 2017; Roossinck, 2020). Durante el año 2019 todas las regiones de Costa Rica reportaron casos de CHIKV, la región Central Norte fue la región con el mayor número de casos (49, 34%) (Ministerio de Salud, 2019).

Virus Zika

El virus del Zika (ZIKV) pertenece al género *Flavivirus*, familia Flaviviridae, reino Orthornavirae y dominio Riboviria. Este flavivirus es pequeño de 40-60nm de diámetro, envuelto, esférico, que contiene un ARN no segmentado monocatenario positivo de aproximadamente 11kb. Codifica diez proteínas (tres proteínas estructurales y siete proteínas no estructurales) Los análisis filogenéticos recientes sugieren que los

aislados de ZIKV que circulan actualmente en América constituyen un nuevo clado del genotipo asiático (Catenacci & Alcantara, 2019). ZIKV ingresó a América en 2015, se asocia con el síndrome de Guillain-Barré y anomalías congénitas como la microcefalia. El número de casos ha disminuido en los últimos 2 años, pero está claro que el ZIKV seguirá siendo una amenaza continua, en particular para las mujeres embarazadas y sus hijos, durante los próximos años (Quanquin et al., 2020). Se conocen dos ciclos, el selvático (entre vertebrados y *Aedes*) y el urbano (entre *Ae. aegypti*, *Ae. albopictus* y humanos). Además de la transmisión vectorial, se da en humanos la transmisión sexual y transmisión sanguínea durante la etapa de viremia (Chaudhry, 2020). El virus del Zika fue aislado por primera vez en 1947 en el bosque de Zika, en Uganda (Posen et al., 2016). En el año 2019 en Costa Rica las regiones Huetar Atlántica, Central Norte, Pacífico Central, Central Este, Chorotega y Central Sur presentaron casos de ZIKV (Ministerio de Salud, 2019).

Control de vectores y haplotipos

Los enfoques tradicionales para el control de los vectores que transmiten arbovirosis generalmente incluyen la aplicación de insecticidas y la reducción de los criaderos (Zheng et al., 2018). Actualmente, también se han considerado nuevas medidas de control, como la técnica de insectos estériles y el reemplazo de la población con mosquitos transgénicos incompetentes para transmitir virus. El objetivo de los programas de control de *Aedes* es reducir la densidad de población de mosquitos adultos por debajo de un umbral crítico donde es poco probable que se produzca la transmisión epidémica (Hemme et al., 2010). En Costa Rica, el Ministerio de Salud utiliza insecticidas piretroides (deltametrina y cipermetrina) y organofosforados (temefós) en las campañas de fumigación dirigidos a eliminar adultos y larvas (Calderón et al., 2018).

El estudio de diferentes genes mitocondriales en poblaciones de *Aedes* ha ayudado a identificar patrones de dispersión, filogenia, variantes genéticas y dinámica poblacional. Además, son útiles para resolver relaciones entre poblaciones de *Aedes*, conocer la variabilidad genética y puede contribuir al diseño de estrategias de control de estos vectores (Mousson et al., 2005; Naim et al., 2020). Los genes más estudiados en *Ae.*

albopictus han sido la región control (D-loop), la Citocromo Oxidasa I (COI), la Nicotina Adenina Deshidrogenasa Subunidad 5 (ND5) y la Nicotina Adenina Deshidrogenasa Subunidad 4 (ND4) (Mousson et al., 2005; Heredia, 2013). El gen mitocondrial de COI es uno de los genes más conservados en el genoma mitocondrial, pocas veces se recombina, lo que refleja una evolución lineal o clonal, además de que muestra una tasa de evolución relativamente rápida, por lo que se considera un gen ideal para estudiar la diversidad genética y la propagación de *Aedes*. En Costa Rica solamente se ha realizado una única investigación sobre la diversidad de *Ae. albopictus* en una población de mosquitos adultos en el distrito de La Virgen, Sarapiquí. En ese estudio se encontró una alta diversidad de haplotipos (Futami et al., 2015). Hasta la fecha se desconoce, si existen diferencias entre larvas de diferentes haplotipos con respecto a la presencia de arbovirus, por lo que se considera importante investigar los haplotipos presentes en una región.

Referencias bibliográficas

Andrew, J., & Bar, A. (2013). Morphology and morphometry of *Aedes aegypti* adult mosquito. *Annual Research & Review in Biology*, 52-69.

Arredondo-García, J. L., Méndez-Herrera, A., & Medina-Cortina, H. (2016). Arbovirus in Latin America. *Acta pediátrica de México*, 37(2), 111-131. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0186-23912016000200111

Bar, A., & Andrew, J. (2013). Morphology and morphometry of *Aedes aegypti* larvae. *Annual Research & Review in Biology*, 1-21.

Bonthius, D. J., & Bale, J. F. (2017). Viral Infections of the Nervous System. *Swaiman's Pediatric Neurology*, 895–906. doi:10.1016/b978-0-323-37101-8.00115-6

Boyer, S., Foray, C., & Dehecq, J. S. (2014) Spatial and Temporal Heterogeneities of *Aedes albopictus* Density in La Reunion Island: Rise and Weakness of Entomological Indices. *PLoS ONE* 9(3): e91170. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0091170>

Calderón-Arguedas, O., Troyo, A., & Solano, M. E. (2004). Diversidad larval de mosquitos (Diptera: Culicidae) en contenedores artificiales procedentes de una comunidad urbana de San José, Costa Rica. *Parasitología latinoamericana*, 59(3-4), 132-136.

Calderón-Arguedas, O., Troyo, A., Solano, M. E., Avendaño, A., & Beier, J. C. (2009). Urban mosquito species (Diptera: Culicidae) of dengue endemic communities in the Greater Puntarenas area, Costa Rica. *Revista de biología tropical*, 57(4), 1223-1234.

Calderón Arguedas, Ó., Vargas, K., & Troyo, A. (2018). Resistencia a insecticidas en cepas de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) de tres distritos de la Región Pacífico Central de Costa Rica. *Revista Cubana de Medicina Tropical*, 70, 1-9.

Cao, J., Deng, H., Ye, L., Ma, X., Chen, S., Sun, X., . . . Liu, L. (2019). Epidemiological and clinical characteristics of Dengue virus outbreaks in two regions of China, 2014–2015. *PloS one*, 14(3), e0213353. doi:<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0213353>

Casas Martínez, M., Orozco Bonilla, A., Muñoz Reyes, M., Ulloa García, A., Bond, J. G., Valle Mora, J., . . . Rojas, J. C. (2013). A new tent trap for monitoring the daily activity of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. *Journal of Vector Ecology*, 38(2), 277-288. doi:10.1111/j.1948-7134.2013.12041.x

Catenacci, L. S., & De Alcantara, B. N. (2019). Zika Virus. *Fowler's Zoo and Wild Animal Medicine Current Therapy*, Volume 9, 280–286. doi:10.1016/b978-0-323-55228-8.00041-2

Chaudhry, M. R. A. (2020). Dengue virus infection outbreak: comparison with other viral infection outbreak. *Dengue Virus Disease*, 17–35. doi:10.1016/b978-0-12-818270-3.00003-5

Chomposri, J., Thavara, U., Tawatsin, A., Boonserm, R., Phumee, A., Sangkitporn, S., & Siriyasatien, P. (2016). Vertical transmission of Indian Ocean Lineage of chikungunya virus in *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* mosquitoes. *Parasites & vectors*, 9(1), 1-13. doi:<https://doi.org/10.1186/s13071-016-1505-6>

Confalonieri, U. E., & Costa Neto, C. (2012). Diversity of mosquito vectors (Diptera: culicidae) in caxiuana, Pará, Brazil. *Interdisciplinary perspectives on infectious diseases*, 2012. <https://doi.org/10.1155/2012/741273>

DeZure, A., & Graham, B. S. (2016). Vaccines for Emerging Viral Diseases. *The Vaccine Book*, 543–560. doi:10.1016/b978-0-12-802174-3.00028-x

Ferreira de Lima, V. H., & Lima Camara, T. N. (2018). Natural vertical transmission of dengue virus in *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*: a systematic review. *Parasites & Vectors*, 11(1), 77. doi:10.1186/s13071-018-2643-9

Futami, K., Valderrama, A., Baldi, M., Minakawa, N., Marin Rodriguez, R., & Chaves, L. F. (2015). New and common haplotypes shape genetic diversity in Asian tiger mosquito populations from Costa Rica and Panamá. *Journal of economic entomology*, 108(2), 761-768.

Galán Huerta, K. A. (2013). Identificación y análisis de las variantes genómicas del virus del dengue y su asociación con la presentación clínica en una zona de baja y otra de alta endemicidad en México. Universidad Autónoma de Nuevo León,

Guo, X.-X., Li, C.-X., Zhang, Y.-M., Xing, D., Dong, Y.-D., Zhang, H.-D., Xing, D., Dong, Y.-D., Zhang, H.-D., Qin, C.-F & Zhao, T.-Y. (2016). Vector competence of *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) for the DEN2-FJ10 and DEN2-FJ11 strains of the dengue 2 virus in Fujian, China. *Acta tropica*, 161, 86-90. doi:<https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2016.05.018>

Gutiérrez Bugallo, G., Rodríguez Roche, R., Díaz Gutiérrez, G., Mendizábal Alcalá, M. E., Peraza Cuesta, I., Pérez Castillo, M., Vasquez Perera, A. A., Rodríguez Coto, M., Alvarez Vera, M., Bisset Lazco, J. A & Guzmán Tirado, M. G. (2018) Transmisión vertical de los virus del dengue en poblaciones cubanas de *Aedes aegypti*.

Gutiérrez-Bugallo, G., Piedra, LA, Rodríguez, M., Bisset, JA, Lourenço-de-Oliveira, R., Weaver, SC, ... y Vega-Rúa, A. (2019). Vector-borne transmission and evolution of Zika virus. *Nat Ecol Evol* 3, 561–569. doi: <https://doi.org/10.1038/s41559-019-0836-z>

Hemme, R., Thomas, C., Chadee, D., & Severson, D. (2010). Influence of Urban Landscapes on Population Dynamics in a Short-Distance Migrant Mosquito. doi:<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000634>

Heredia, C. (2013). Caracterización de haplotipos del gen mitocondrial ND4 en poblaciones de *Aedes aegypti* (vector del dengue) de las comunidades de san Borja y Caranavi (Doctoral dissertation).

Hernández Chavarría, F., & García, J. D. (2000). *Aedes*, Dengue y la posibilidad de un enfoque diferente de lucha. *Revista Costarricense de Salud Pública*, 9, 32-38.

Khetarpal, N., & Khanna, I. (2016). Dengue Fever: Causes, Complications, and Vaccine Strategies. *Journal of Immunology Research*, 2016, 6803098. doi:[10.1155/2016/6803098](https://doi.org/10.1155/2016/6803098)

Kraemer, M. U. G., Sinka, M. E., Duda, K. A., Mylne, A., Shearer, F. M., Brady, O. J., Messina, J. P., Barker, C. M., Moore, C. G., Carvalho, R. G., Coelho, G. E., Bortel, W. V., Hendrickx, G., Schaffner, F., Wint, G. R. W., Elyazar, I. R. F., Teng, H. & Hay, S. I. (2015). The global compendium of *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus* occurrence. *Scientific Data*, 2(1), 150035. doi:[10.1038/sdata.2015.35](https://doi.org/10.1038/sdata.2015.35)

Kyle, J. L., & Harris, E. (2008). Global Spread and Persistence of Dengue. *Annual Review of Microbiology*, 62(1), 71-92. doi:[10.1146/annurev.micro.62.081307.163005](https://doi.org/10.1146/annurev.micro.62.081307.163005)

Ledezma Acevedo, J. G., Rodríguez Cardenas, N., & Ureña Picado, J. (2018). Digital cartographic tools in surveillance of diseases transmitted by *Aedes* spp; Case in Costa Rica. *Revista Costarricense de Salud Pública*, 27(1), 87-101.

Lequime, S., Paul, R. E., & Lambrechts, L. (2016). Determinants of arbovirus vertical transmission in mosquitoes. *PLoS pathogens*, 12(5), e1005548. doi:<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005548>

Leydesdorff, L. (2008). On the normalization and visualization of author co-citation data: Salton's Cosine versus the Jaccard index. *Journal of the American Society for Information Science and Technology*, 59(1), 77-85. doi:<https://doi.org/10.1002/asi.20732>

Martínez Fernández, L., & Torrado Navarro, Y. P. (2015). Fiebre Chikungunya. *Revista Cubana de Medicina*, 54(1), 74-96.

Maniero, V. C., Rangel, P. S. C., Coelho, L. M. C., Silva, C. S. B., Aguiar, R. S., Lamas, C. C., & Cardozo, S. V. (2019). Identification of Zika virus in immature phases of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*: a surveillance strategy for outbreak anticipation. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 52.

McKenzie, B. A., Wilson, A. E., & Zohdy, S. (2019). *Aedes albopictus* is a competent vector of Zika virus: A meta-analysis. *PloS one*, 14(5), e0216794. doi:<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0216794>

Ministerio de Salud de Costa Rica. (2020). Analisis de situacion de salud: Boletin epidemiologico Dengue, Chikungunya y Zika. Retrived from: <https://www.ministeriodesalud.go.cr/index.php/vigilancia-de-la-salud/analisis-de-situacion-de-salud>

Ministerio de Salud de Costa Rica. (2019). Boletín epidemiológico mensual Semana epidemiológica 46 <https://www.ministeriodesalud.go.cr/index.php/vigilancia-de-la-salud/boletines/4519-boletin-epidemiologico-mensual-semana-epidemiologica-46/file>

Ministerio de Salud de Costa Rica. (2017). Análisis de situación de salud: Boletín epidemiológico Zika, Chikungunya y Dengue. Retrieved from <https://www.ministeriodesalud.go.cr/index.php/biblioteca-de-archivos/vigilancia-de-la-salud/analisis-de-situacion-de-salud>

Moreno, C. E. (2000). Métodos para medir la biodiversidad. Volumen 1. Manuales y tesis SEA.

Morris, E. K., Caruso, T., Buscot, F., Fischer, M., Hancock, C., Maier, T. S., Meiners, T., Muller, C., Obermaier, E., Prati, D., Cocher, S. A., Sonnemann, I., Waschke, N., Wubet, T., Wurst, S. & Rillig, M. C. (2014). Choosing and using diversity indices: insights for ecological applications from the German Biodiversity Exploratories. *Ecology and evolution*, 4(18), 3514-3524. <https://doi.org/10.1002/ece3.1155>

Mousson, L., Dauga, C., Garrigues, T., Schaffner, F., Vazeille, M., & Failloux, A. B. (2005). Phylogeography of *Aedes* (*Stegomyia*) *aegypti* (L.) and *Aedes* (*Stegomyia*) *albopictus* (Skuse)(Diptera: Culicidae) based on mitochondrial DNA variations. *Genetics Research*, 86(1), 1-11. <http://doi.org/10.1017/S001667230500762>

Naim, D. M., Kamal, N. Z. M., & Mahboob, S. (2020). Population structure and genetic diversity of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in Penang as revealed by mitochondrial DNA cytochrome oxidase I. *Saudi journal of biological sciences*, 27(3), 953-967.

Nelson, M. J. (1986). *Aedes aegypti*: Biology and ecology.

OECD (2018), *Safety Assessment of Transgenic Organisms in the Environment*, Volume 8: OECD Consensus Document of the Biology of Mosquito *Aedes aegypti*, Harmonisation of Regulatory Oversight in Biotechnology, OECD Publishing, Paris, <https://doi.org/10.1787/9789264302235-en>.

OPS, O. P. d. I. S. (2020). Actualización Epidemiológica Dengue Retrieved from https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&view=download&category_slug=2020-alertas-epidemiologicas&alias=51691-7-de-febrero-de-2020-dengue-actualizacion-epidemiologica&Itemid=270(=es

Powell, J. R., & Tabachnick, W. J. (2013). History of domestication and spread of *Aedes aegypti*-A Review. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 108, 11-17. doi:<https://doi.org/10.1590/0074-0276130395>

Posen, H. J., Keystone, J. S., Gubbay, J. B., & Morris, S. K. (2016). Epidemiology of Zika virus, 1947–2007. *BMJ global health*, 1(2), e000087. doi:<http://dx.doi.org/10.1136/bmjgh-2016-000087>

Quanquin, N., Adachi, K., & Nielsen-Saines, K. (2020). Zika virus. *Maternal Immunization*, 289–319. doi:10.1016/b978-0-12-814582-1.00014-0

Rey, J. R., & Lounibos, P. (2015). Ecology of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in the Americas and disease transmission. *Biomédica*, 35(2), 177-185.

Rojas-Araya, D., Marín-Rodríguez, R., Gutiérrez-Alvarado, M., Romero-Vega, L. M., Calderón-Arguedas, O., & Troyo, A. (2017). Nuevos registros de *Aedes albopictus* (Skuse) en cinco localidades de Costa Rica. *REVISTA BIOMÉDICA*, 28(2). doi:doi: <https://doi.org/10.32776/revbiomed.v28i2.572>

Roossinck, M. (2020). *Virus 101 Incredible Microbes from Coronavirus to Zika*. London, United Kingdom: Ivy Press.

Rueda, L. M. (2004). Pictorial keys for the identification of mosquitoes (Diptera: Culicidae) associated with dengue virus transmission. Walter Reed Army Inst Of Research Washington Dc Department Of Entomology.

Sim, S., & Hibberd, M. L. (2016). Genomic approaches for understanding dengue: insights from the virus, vector, and host. *Genome Biology*, 17(1), 38. doi:10.1186/s13059-016-0907-2

Thangamani, S., Huang, J., Hart, C. E., Guzman, H., & Tesh, R. B. (2016). Vertical Transmission of Zika Virus in *Aedes aegypti* Mosquitoes, *The American Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 95(5), 1169-1173. doi: <https://doi.org/10.4269/ajtmh.16-0448>.

Torres-Avendaño, J. I., Hilario-Torres-Montoya, E., Zazueta-Moreno, J. M., Olimón-Andalón, V., Romero-Higareda, C., Salomón-Soto, V. M., Flores-Lopez, B. A. & Castillo-Ureta, H. (2020). Índices Entomológicos de Ovitrampra y de Casa Para *Aedes Aegypti*1 En Una Zona Rural de Sinaloa, México. *Southwestern Entomologist*, 45(1), 241-250.

Zahoor, M. K., Rasul, A., Zahoor, M. A., Sarfraz, I., Zulhussnain, M., Rasool, R., Majeed, D., Jebeen, F. & Ranian, K. (2019). Dengue fever: a general perspective. *Dengue Fever: a Resilient Threat in the Face of Innovation*, 1. doi:<http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.81277>

Zapletal, J., Gupta, H., Erraguntla, M., Adelman, Z. N., Myles, K. M., & Lawley, M. A. (2019). Predicting aquatic development and mortality rates of *Aedes aegypti*. *PloS one*, 14(5), e0217199. doi:<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0217199>

Zheng, B., Yu, J., Xi, Z., & Tang, M. (2018). The annual abundance of dengue and Zika vector *Aedes albopictus* and its stubbornness to suppression. *Ecological Modelling*, 387, 38-48. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ecolmodel.2018.09.004>

ARTÍCULO I

Evaluación de índices de diversidad de culícidos y detección de los virus dengue, chikungunya y Zika en larvas de *Aedes albopictus* en Costa Rica

Resumen

Las enfermedades ocasionadas por el virus de dengue (DENV), Zika virus (ZIKV) y virus de chikungunya (CHIKV) son transmitidas, entre otros, por *Aedes albopictus* en forma horizontal a los humanos, a través de la picadura de un mosquito hembra infectado; sin embargo, la hembra puede pasar el virus de manera vertical o transovárica a sus descendientes, permitiendo así a estos arbovirus persistir en periodos interepidémicos en huevos y larvas. Datos del 2020 reportaron 9400 casos DENV, 49 casos CHIKV y 121 casos ZIKV, mostrando que estos arbovirus representan un problema importante para la salud pública de Costa Rica. Es por eso, que el objetivo del presente trabajo fue determinar los índices de diversidad de culícidos y detectar la presencia de DENV, CHIKV y ZIKV en larvas de *Ae. albopictus*, para determinar dominancias de especies y evidenciar la transmisión transovárica de estos virus en Costa Rica. Se recolectaron larvas de mosquitos en 26 localidades de 19 distritos durante la época lluviosa de Costa Rica, los cuales se identificaron a nivel de especie (*Aedes* y *Culex*) o género (*Limatus*) y se calcularon diversos índices de diversidad. Las larvas de *Ae. albopictus* se sometieron a análisis molecular para detectar la presencia de DENV, ZIKV y CHIKV. En total se recolectaron 5036 larvas de 8 especies distintas, *Aedes aegypti* resultó ser la especie más abundante (n=3188, 63%), seguida de *Ae. albopictus* (n=701, 14%). Se reporta por primera vez la presencia de larvas de *Ae. albopictus* (n=105) en la localidad de Punta Morales. Guácimo y La Virgen fueron los distritos con mayor riqueza de culícidos, encontrándose un total de seis especies, mientras que en Jacó, La Suiza y Pital únicamente se encontró *Ae. aegypti*. Pavones fue el distrito con mayor y Siquirres con menor equitatividad de diversidad y abundancia. Los grupos de larvas de *Ae. albopictus* (n=23) resultaron negativos a DENV, CHIKV y ZIKV en reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa en tiempo real. Se recomienda realizar investigaciones sistemáticas para determinar índices de diversidad tanto en estación lluviosa como en estación seca, de

diferentes localidades, así como seguir recolectando larvas de *Ae. albopictus* en zonas con brotes de arbovirosis para demostrar la transmisión vertical.

Abstract

The diseases caused by the dengue virus (DENV), Zika virus (ZIKV) and chikungunya virus (CHIKV) are transmitted, among others, by *Aedes albopictus* horizontally to humans, through the bite of an infected female mosquito. However, the female can pass the virus vertically or transovarial to her offspring, thus allowing these arboviruses to persist in inter-epidemic periods in eggs and larvae. Data from 2020 reported 9400 DENV cases, 49 CHIKV cases, and 121 ZIKV cases, showing that these arboviruses represent an important public health problem in Costa Rica. For this reason, the objective of this investigation was to determine the diversity index of culicids and detect the presence of DENV, CHIKV and ZIKV in *Ae. albopictus* larvae, to determine species dominance and detect the presence of transovarial transmission of these viruses in Costa Rica. Mosquito larvae were collected in 26 locations of 19 districts during the rainy season, identified at the species (*Aedes* and *Culex*) or genus (*Limatus*) level, and various diversity index were calculated. The larvae of *Ae. albopictus* were subjected to molecular analysis to detect the presence of DENV, ZIKV and CHIKV. A total of 5036 larvae of 8 different species were collected, *Aedes aegypti* being the most abundant species (n=3188, 63%), followed by *Ae. albopictus* (n=701, 14%). For the first time the presence of *Ae. albopictus* (n=105) is reported in the location of Punta Morales. Guácimo and La Virgen were the districts with more richness of culicids, finding a total of six species, while in Jacó, La Suiza and Pital only one species was found, *Ae. aegypti*. Pavones was the district with the highest and Siquirres the district with the lowest diversity and abundance of culidicids. The groups of larvae of *Ae. albopictus* (n=23) were negative for DENV, CHIKV and ZIKV in reverse transcriptase real time polymerase chain reaction. It is recommended to carry out systematic investigations to determine diversity indices both, in the rainy season and in the dry season, in different locations, as well as continuing collecting *Ae. albopictus* in areas with arboviral outbreaks to demonstrate vertical transmission.

1. Introducción

Una herramienta utilizada para expresar cuantitativamente la biodiversidad y riqueza de especies de insectos en un área, son los índices de diversidad, que muestran la variedad y heterogeneidad de diversas de especies en una región (Morris et al., 2014), para establecer especies endémicas y exóticas, analizar cambios en la diversidad de especies, y analizar las similitudes o dominancias de las especies estudiadas en un periodo determinado, todo con la finalidad de estudiar factores como la existencia de competencia vectorial y cambios de comportamiento según las condiciones del lugar (Confalonieri & Costa, 2012).

En la última década se ha reconocido al mosquito *Aedes albopictus* como vector biológico competente para más de 26 virus, entre éstos, el virus del dengue (DENV), virus de Chikungunya (CHIKV) y el Zika virus (ZIKV) (McKenzie et al., 2019). Estos arbovirus se transmiten a través de la picadura del mosquito del género *Aedes*, el cual se infecta cuando ingiere sangre de un huésped virémico (Sim & Hibberd, 2016). Esto puede ocurrir en el ciclo selvático, entre especies de *Aedes* y primates no humanos, o en el ciclo urbano, entre *Aedes aegypti* o *Ae. albopictus* y humanos (Martínez & Torrado, 2015), conociéndose este mecanismo como transmisión horizontal. Sin embargo, también se ha demostrado en forma experimental y natural la transmisión transovárica de DENV, CHIKV y ZIKV, que ocurre por infección de los tejidos germinales del insecto. La transmisión transovárica permite a estos arbovirus persistir en periodos interepidémicos en huevos y larvas (Agarwal et al., 2014; Chompoonsri et al., 2016; Ferreira & Lima, 2018; Gutiérrez et al., 2018; Gutiérrez et al., 2019; Thangamani et al., 2016).

El virus del dengue, perteneciente al género Flavivirus (Khetarpal & Khanna, 2016), con cuatro serotipos (DENV-1 a DENV-4) antigénicamente distintos (Guo et al., 2016), representa el arbovirus de mayor importancia a nivel mundial. Se estima que aproximadamente dos quintas partes de la población está en riesgo de contraer una infección y anualmente 500.000 personas se ven afectadas por la fase hemorrágica de la enfermedad, con tasas de mortalidad que superan el 20%. En América se ha asociado sobre todo la presencia del DENV-2 con epidemias de dengue grave (Galán,

2013). El DENV reemergió en 1993 en Costa Rica, después de haber estado ausente por 38 años (Trejos et al., 1999). Su presencia ha sido reportada desde entonces en todas las regiones del país, afectando principalmente el Pacífico Central, la región Chorotega y Huetar Atlántica (Ledezma et al., 2018; Ministerio de Salud, 2020).

En diciembre de 2013 el virus chikungunya, perteneciente al género Alphavirus se reportó por primera vez en el continente americano en la isla de San Martín, y en siete meses se reportaron más de 400.000 casos en 20 países del Caribe y América Central (DeZure & Graham, 2016; Feldstein et al., 2016), que cursaron con meningoencefalitis, lesiones de sustancia blanca, edema cerebral, hemorragia intracraneal, síntomas hemorrágicos y miocarditis (Arredondo et al., 2016; Martínez & Torrado, 2015; Roossinck, 2020). El CHIKV se reportó por primera vez en Costa Rica en 2014 y desde entonces se han reportado casos en todas las regiones del país, siendo la región Central Norte la región con el mayor número de casos (49,34%) (Ministerio de Salud, 2019; Sanchez et al., 2018).

Finalmente, en julio del 2015 el virus del Zika, perteneciente al género Flavivirus y estrechamente relacionado con el DENV, se reportó por primera vez en América en Brasil (Catenacci & Alcantara, 2019; Plourde & Bloch, 2016) y en cinco meses el virus se extendió rápidamente a países de América Central y el Caribe (Fellner, 2016). A finales del 2016 en el continente americano se reportaron más de 532.000 casos sospechosos de Zika, con 175.063 casos confirmados, ocasionando el síndrome de Guillain-Barré y microcefalia, por lo que representa sobre todo un riesgo para las mujeres embarazadas y sus hijos (Quanquin et al., 2020). El ZIKV se reportó por primera vez en el 2016 en Costa Rica, y desde entonces se han detectado casos en todas las regiones de Costa Rica.

Datos del 2020 reportaron 9400 casos DENV, 49 casos CHIKV y 121 casos ZIKV (Ministerio de Salud, 2020), mostrando que estos arbovirus representan un problema importante para la salud pública de Costa Rica. Con la presencia del DENV en un grupo de machos de *Ae. albopictus* en el distrito de La Virgen, Sarapiquí, se estableció transmisión transovárica; sin embargo, se desconoce cuáles serotipos de DENV se

transmiten en forma vertical, además, si los virus CHIKV y ZIKV se transmiten de forma transovárica en Costa Rica.

El objetivo del presente trabajo fue determinar índices de diversidad de culícidos y determinar la presencia de los DENV, CHIKV y ZIKV en larvas de *Ae. albopictus*, para evaluar la transmisión transovárica de estos virus.

2. Materiales y Métodos

2.1 Tipo de estudio y muestra

Se realizó un estudio de tipo transversal y descriptivo, en el cual se recolectaron larvas de culícidos (*Aedes*, *Culex* y *Limatus*) durante la época lluviosa, en colaboración con la Dirección de Vigilancia de Vectores del Ministerio de Salud entre agosto y noviembre de 2021. Las larvas se recolectaron en 26 localidades de 19 distritos, en donde se muestrearon calles, aceras y playas (seleccionadas al azar), y en las que se recolectaron todas las larvas de mosquitos encontradas en criaderos como llantas, cubetas, chatarra, etc. Las larvas se recolectaron volcando el contenido de los criaderos y filtrando con un colador de malla fina el agua, luego introduciendo las larvas en un frasco plástico con agua y tapa. En los casos de criaderos de gran tamaño o imposibles de mover se capturaron las larvas pasando el colador por la parte más superficial del recipiente o con ayuda de pipetas plásticas de Pasteur. Las larvas se colocaron en recipientes con agua según la localidad y se transportaron vivas al laboratorio, donde se procedió a identificarlas inmediatamente.

2.2 Identificación de las larvas

La identificación taxonómica de las larvas de *Aedes* se realizó utilizando las claves morfológicas descritas por Rueda (2004), y la identificación de *Culex* y *Limatus* utilizando las claves morfológicas descritas por Rossi & Almiron (2006). Todas se identificaron mediante estereoscopio, y una vez identificadas, se separaron las larvas de *Ae. albopictus*, las cuales se agruparon en grupos de hasta 50 larvas, y se congelaron inmediatamente a -80°C hasta su procesamiento.

2.3 Índices de diversidad

En una base de datos en Excel se incluyó la siguiente información de los culícidos: provincia, distrito, localidad, lugar y tipo de criadero en el que se encontraron, si la localidad fue reportada como localidad con brote en el momento de la recolecta, cantidad de larvas *Ae. albopictus*, *Ae. aegypti*, larvas de *Culex corniger*, *Culex coronaro*, *Culex interrogator*, *Culex nigripalpus*, *Culex quinquefasciatus* y *Limatus* en todos los estadios (L1-L4) encontradas en el lugar. Se estableció el total de larvas por género en cada localidad.

Además, se estableció presencia/ausencia de culícidos a nivel de distritos y se calcularon los siguientes índices de diversidad:

El índice de Jaccard, que mide el grado de similitud y diferencias en comparación con presencia y ausencia de especies encontradas (Leydesdorff, 2008), y se determina con la siguiente fórmula:

$$I_j = c/a + b - c$$

Donde: a= número de especies en el sitio A, b= número de especies en el sitio B y c= número de especies en común en ambos lugares (A y B). El intervalo oscila entre 0 (cuando no hay especies compartidas en ambos lugares) y 1 (cuando los dos lugares comparten las mismas especies).

El índice de Shannon–Weaver, que analiza la diversidad combinando la riqueza específica y la equitatividad de los culícidos encontrados. Mide el grado para predecir a qué especie pertenecerá un individuo escogido de manera al azar en una colección, asumiendo que todas las especies están representadas en la muestra (Moreno, 2000). Se calcula mediante la siguiente fórmula:

$$H = -\sum(p_i) (\ln p_i)$$

Donde: p_i = abundancia relativa de cada especie en la población y $\ln p_i$ = logaritmo natural de p_i . Valores inferiores a 2 se consideran bajos en biodiversidad y superiores a 3 altos en biodiversidad de especies.

El índice de Margalef, que corresponde a un indicador de la riqueza específica donde se transforma el número de especies por muestra a una proporción a la cual las especies son añadidas por expansión de la muestra. Supone que hay una relación funcional entre el número de especies y el número total de individuos (Moreno, 2000).

$$DMg = s - 1 / \ln(n)$$

Donde: s = riqueza de especies y n = número total de individuos. Valores inferiores a dos son considerados bajos en biodiversidad y valores superiores a cinco son indicativos de alta biodiversidad.

El indicador de Pielou para conocer si la abundancia de individuos por especies es semejante. Mide la proporción de diversidad observada con relación a la máxima diversidad esperada (Moreno, 2000).

$$J = H' / H'_{\max}$$

Donde: H = índice de Shannon-Waver y H'_{\max} = logaritmo del número total de especies presentes. Sus valores oscilan de 0 (representando la ausencia de uniformidad) y 1 (donde todas las especies son igual de abundantes).

2.4 Análisis molecular

Los grupos de larvas *Ae. albopictus* se sometieron a extracción de ARN mediante el kit NORGEN Total ARN Purification, siguiendo los pasos recomendados por el fabricante. Posterior a las extracciones, se determinó la calidad y cantidad del ARN extraído (NanoDrop One, Thermo Scientific) y se almacenó a -20°C hasta su análisis mediante la prueba de reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa en tiempo real (RT-qPCR) utilizando el protocolo descrito por Waggoner et al. (2016). Para DENV se amplificó la región no traducida 5' (UTR) del gen de la cápside, para CHIKV la proteína no estructural 2 (NSP2) y para ZIKV la proteína no estructural 4B (NS4B). Se utilizaron los cebadores y sondas descritas en el Cuadro 1 preparando reacciones de 25 μl que incluyeron 0.5 μl del kit SuperScript III Platinum One-Step qRT-PCR (Life Technologies, Carlsbad, CA, EE. UU.), 12.5 μl Maxima Probe/ROX qPCR Master Mix - 2X (Thermo Scientific, Waltham, USA), 0.25 μl de cada sonda a concentración de 10 μM , 0.75 μl de cada iniciador a una concentración de 10 μM , más 5 μl de ARN y 5 μl de

agua grado biología molecular (Thermo Scientific). Todas las reacciones de RT-qPCR se analizaron en el ABI 7500 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE. UU.) Las condiciones de ciclo del ensayo fueron las siguientes: 52°C durante 15 min; 94°C durante 2 min; 45 ciclos a 94°C durante 15 segundos, 55°C durante 20 segundos y 68°C durante 20 segundos. Todas las muestras que cruzaron el umbral (0,025) antes del ciclo 40 se consideraron positivas. Como control positivo se utilizaron cultivos celulares de los tres arbovirus suministrados por el Instituto Costarricense de Investigación y Enseñanza en Nutrición y Salud (INCIENSA).

Cuadro 1. Sondas y cebadores utilizados en qRT-PCR para detectar los virus dengue, chikungunya, y Zika en larvas de *Ae. albopictus* de Costa Rica.

Agente	Tamaño	Sonda	Cebadores
DENV 1	114 pb	Sonda A: CTCGCGCGTTTCAGCATAT	Cebador F1: CAGATCTCTGATGAACAACCAACG Cebador R1: TTTGAGAATCTCTTCGCCAAC
DENV2	85 pb	Sonda B: CAGATCTCTGATGAATAACCAACG	Cebador F1: CAGATCTCTGATGAACAACCAACG Cebador F2: CAGATCTCTGATGAATAACCAACG Cebador R2: AGTTGACACGCGGTTTCTCT Cebador R3: AGTCGACACGCGGTTTCTCT
DENV3	114 pb	Sonda C: CTCTCACGTTTCAGCATATTG	Cebador F1: CAGATCTCTGATGAACAACCAACG Cebador F3: CAGATTTCTGATGAACAACCAACG
DENV4	110 pb	Sonda D: CTCACGCGTTTCAGCATAT	Cebador F4: GATCTCTGGAAAAATGAAC Cebador R4: AGAATCTCTTCACCAACC
CHIKV	96 pb	Sonda E: GCGGTGTACACTGCCTGTGACYGC	Cebador F5: CATCTGCACYCAAGGTACCA Cebador R5:

			GCGCATTTTGCCTTCGTAATG
ZIKV	100 pb	Sonda F: CYGTTGTGGATGGAATAGTGG	Cebador F6 CAGCTGGCATCATGAAGAAYC Cebador R6: CACTTGTCCCATCTTCTTCTCC Cebador R7: CACCTGTCCCATCTTTTCTCC

3. Resultados

Se recolectaron larvas en 26 localidades de 19 distritos de Costa Rica, donde se encontró un total de 5036 larvas y ocho especies distintas de culícidos (*Ae. albopictus*, *Ae. aegypti*, *Culex corniger*, *Culex coronator*, *Culex interrogator*, *Culex nigripalpus*, *Culex quinquefasciatus* y *Limatus* spp). La mayor cantidad de larvas correspondían a *Ae. aegypti* con 3188 (63%), seguido de *Aedes albopictus*, que fue el segundo insecto más recolectado con 701 (14%) y *Culex coronator* con la menor cantidad de ejemplares recolectados 14 (0,3%) larvas.

Las especies encontradas no presentaron una distribución uniforme en los distritos analizados. Solamente en los distritos de El Cairo y Chomes; Buenos Aires y Guápiles; Jacó, La Suiza y Pital se encontraron las mismas especies. En el distrito de Tárcoles se recolectó el mayor número de larvas (838), mientras que en Pavones el menor número de larvas (24) (Cuadro 2). Por otro lado, con el índice de Jaccard se midieron las diferencias en relación con la presencia o ausencia de especies encontradas entre distritos (Cuadro 3). Guácimo y La Virgen fueron los distritos con mayor riqueza específica, con un total de 6 especies cada uno (Cuadro 4). El índice de Shannon-Weaver estableció el distrito de Guácimo como el distrito que presentó la diversidad más elevada (1,30), con respecto a la variedad de especies en el ecosistema y la abundancia relativa. En este se encontraron seis (*Ae. aegypti*, *Ae. albopictus*, *C. corniger*, *C. nigripalpus*, *C. quinquefasciatus*, *Limatus* spp) de las ocho especies, sin embargo, valores inferiores a 2 se consideran bajos en biodiversidad. Mientras que Jacó, La Suiza y Pital fueron las con más bajas con (0), encontrándose únicamente *Ae. aegypti* (Cuadro 4).

Mediante el índice de Margalef se determinó una baja biodiversidad en todos los distritos, Daniel Flores fue el que presentó un mayor valor (0,89). Por otro lado, los distritos de Jacó, La Suiza y Pital fueron los distritos con menor diversidad, encontrándose en ellos únicamente una especie (*Ae. aegypti*). Pavones fue el distrito con mayor equitatividad (0,84) y Siquirres el distrito con menor equitatividad (0,31) con respecto a la proporción de diversidad y abundancia determinado mediante el índice de Pielou (Cuadro 4).

Cuadro 2. Índice de riqueza de especies en los 19 distritos de Costa Rica, 2021.

Especies/ Distrito	<i>Aedes aegypti</i>	<i>Aedes albopictus</i>	<i>Culex corniger</i>	<i>Culex coronaro</i>	<i>Culex interrogator</i>	<i>Culex nigripalpus</i>	<i>Culex quinquefasciatus</i>	<i>Limatus spp.</i>	Total
Buenos Aires	30	34	0	0	0	0	0	2	66
Daniel Flores	2	28	0	0	5	5	0	50	90
San Isidro	134	15	0	0	0	0	0	0	149
Chomes	429	105	3	2	0	0	0	45	584
Tarcoles	520	203	115	0	0	0	0	0	838
Puerto Viejo	478	33	0	0	0	120	0	0	631
La Virgen	219	85	5	0	8	17	0	158	492
El Cairo	185	12	106	12	0	0	0	72	387
Guacimo	273	106	32	0	0	19	7	79	516
Guapiles	49	74	0	0	0	0	0	8	131
Rita	98	6	0	0	0	114	0	37	255
Jacó	233	0	0	0	0	0	0	0	233
La Isabel	34	0	3	0	0	0	3	13	53
Turrialba	106	0	13	0	1	0	15	50	185
La Suiza	180	0	0	0	0	0	0	0	180
Pavones	4	0	0	0	15	5	0	0	24
Tucurrique	50	0	1	0	0	0	0	4	55
Siquirres	51	0	0	0	0	3	0	0	54
Pital	113	0	0	0	0	0	0	0	113
Total	3188	701	278	14	29	283	25	518	5036

Cuadro 3. Grado de similitud y diferencias en comparación con presencia y ausencia de todas las especies encontradas (Índice de Jaccard) en 19 distritos de Costa Rica, 2021.

	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
1	0,60	0,67	0,60	0,50	0,50	0,50	0,60	0,50	1	0,75	0,33	0,40	0,33	0,33	0,20	0,50	0,25	0,33
2		0,40	0,43	0,33	0,60	0,83	0,43	0,57	0,60	0,80	0,20	0,29	0,43	0,20	0,60	0,33	0,40	0,20
3			0,40	0,67	0,67	0,33	0,40	0,33	0,67	0,50	0,50	0,20	0,17	0,50	0,25	0,25	0,33	0,50
4				0,60	0,33	0,57	1	0,57	0,60	0,50	0,20	0,50	0,43	0,20	0,14	0,60	0,17	0,20
5					0,50	0,50	0,60	0,50	0,50	0,40	0,33	0,40	0,33	0,33	0,20	0,50	0,25	0,33
6						0,50	0,33	0,50	0,50	0,75	0,33	0,17	0,14	0,33	0,50	0,20	0,67	0,33
7							0,57	0,71	0,50	0,67	0,17	0,43	0,57	0,17	0,50	0,50	0,33	0,17
8								0,57	0,60	0,50	0,20	0,50	0,43	0,20	0,14	0,60	0,17	0,20
9									0,50	0,67	0,17	0,67	0,57	0,17	0,29	0,50	0,33	0,17
10										0,75	0,33	0,40	0,33	0,33	0,20	0,50	0,25	0,33
11											0,25	0,33	0,29	0,25	0,40	0,40	0,50	0,25
12												0,25	0,20	1	0,33	0,33	0,50	1
13													0,80	0,25	0,17	0,75	0,20	0,25
14														0,20	0,33	0,60	0,17	0,20
15															0,33	0,33	0,50	1
16																0,20	0,67	0,33
17																	0,25	0,33
18																		0,50

1 Buenos Aires, 2 Daniel Flores, 3 San Isidro, 4 Chomes, 5 Tarcoles, 6 Puerto Viejo, 7 La Virgen, 8 El Cairo, 9 Guacimo, 10 Guapiles, 11 Rita, 12 Jacó, 13 La Isabel, 14 Turrialba, 15 La Suiza, 16 Pavones, 17 Tucurrique, 18 Siquirres, y 19 Pital.

Cuadro 4. Riqueza específica (S), índice de Shannon-Weaver (H), índice de Margalef (DMg) e índice de Pielou (J) de todas las especies encontradas en los 19 distritos de Costa Rica, 2021.

Índices de diversidad	Riqueza específica (S)	Índice de Shannon-Weaver (H)	Índice de Margalef (DMg)	Índice de Pielou (J)
Buenos Aires	3	0,81	0,48	0,73
Daniel Flores	5	1,10	0,89	0,68
San Isidro	2	0,33	0,20	0,47
Chomes	5	0,78	0,63	0,46
Tárcoles	3	0,91	0,30	0,83
Puerto Viejo	3	0,68	0,31	0,62
La Virgen	6	1,26	0,81	0,70
El Cairo	5	1,24	0,67	0,77
Guácimo	6	1,30	0,80	0,73
Guápiles	3	0,86	0,41	0,78
Rita	4	1,10	0,54	0,79
Jacó	1	0,00	0,00	0,00
La Isabel	4	0,95	0,77	0,69
Turrialba	5	1,09	0,77	0,68
La Suiza	1	0,00	0,00	0,00
Pavones	3	0,92	0,63	0,84
Tucurrique	3	0,35	0,50	0,32
Siquirres	2	0,21	0,25	0,31
Pital	1	0,00	0,00	0,00

Ae. albopictus se encontró en 11 de 19 distritos y en 15 de 26 localidades. En 14 de estas localidades (Buenos Aires, Concepción, San Isidro de El General, Playa Azul, Tárcoles, Naranjal 1, Naranjal 2, La Chilera, Las Palmas, El Cairo, Afriquita, La Angelina, Los Diamantes y Rita) se había reportado con anterioridad la presencia de este artrópodo, mientras que es la primera vez que se reporta en la localidad de Punta Morales, y se logró capturar un total de 105 larvas, representando la segunda localidad con mayor número de ejemplares de *Ae. albopictus* capturados, después de la localidad de Tárcoles con 130 ejemplares (Cuadro 5). Punta Morales también fue la única localidad de la que se obtuvieron larvas de *Ae. albopictus* durante un brote activo de DENV, mientras que en Barrio La Margot y La Mora, no se encontró ni un ejemplar

en presencia de brotes activos de DENV y reportes previos de presencia del artrópodo. Las 11 localidades restantes (Jacó, La Mora, Barrio la Margot, La Suiza, Esclabón, La Carmen Lira, Tucurrique, San Rafael, San Martín, La Selva y Pital) no presentaron brotes activos de DENV, CHIKV o ZIKV y en éstas no se logró recolectar ningún ejemplar, aunque se había reportado con anterioridad la presencia del artrópodo (Cuadro 5).

Ninguno de los 23 grupos de larvas de *Ae. albopictus* que fueron analizados mediante RT-qPCR resultó positivo para arbovirus (dengue, chikungunya y Zika) (Figura 1-3).

Cuadro 5. Cantidad de larvas *Ae. albopictus* encontradas y número de grupos analizados mediante RT-qPCR para DENV, ZIKV y CHIKV en 11 distritos de Costa Rica.

Distrito	Localidad	Cantidad de larvas encontradas	Grupos analizados
Buenos Aires	Buenos Aires	34	1
Daniel Flores	Concepción	28	1
San Isidro de El General	San Isidro de El General	15	1
Chomes	Punta Morales	35	3
Chomes		35	
Chomes		35	
Tárcoles	Playa Azul	50	2
Tárcoles		23	
Tárcoles	Tárcoles	50	3
Tárcoles		50	
Tárcoles		30	
Puerto Viejo	Naranjal 2	30	1
Puerto Viejo	Naranjal 1	3	1
La Virgen	La Chilera	42	1
La Virgen	Las Palmas	43	1
El Cairo	El Cairo	12	1
Guácimo	Afriquita	42	1
Guácimo	La Angelina	50	2
Guácimo		14	
Guápiles	Los Diamantes	33	3

Guápiles		33	
Guápiles		8	
Rita	Rita	6	1

* Localidad con brote activo de DENV

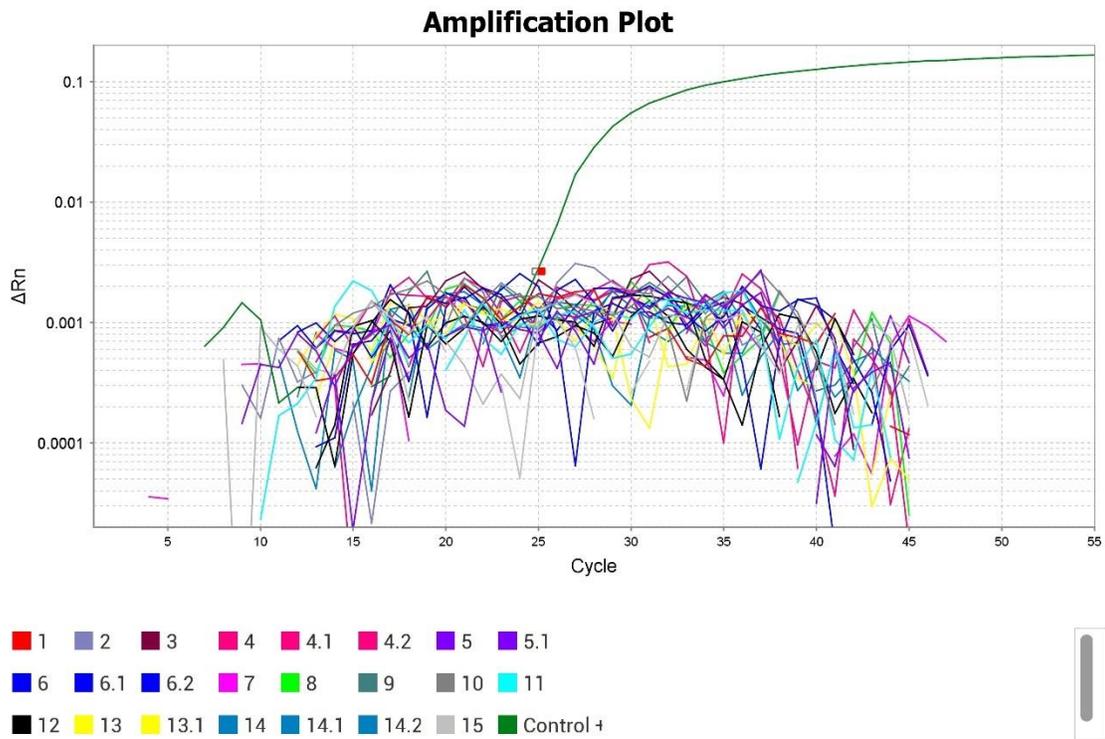


Figura 1. Resultados de los 23 grupos de larvas analizados por RT-qPCR para detección de DENV.

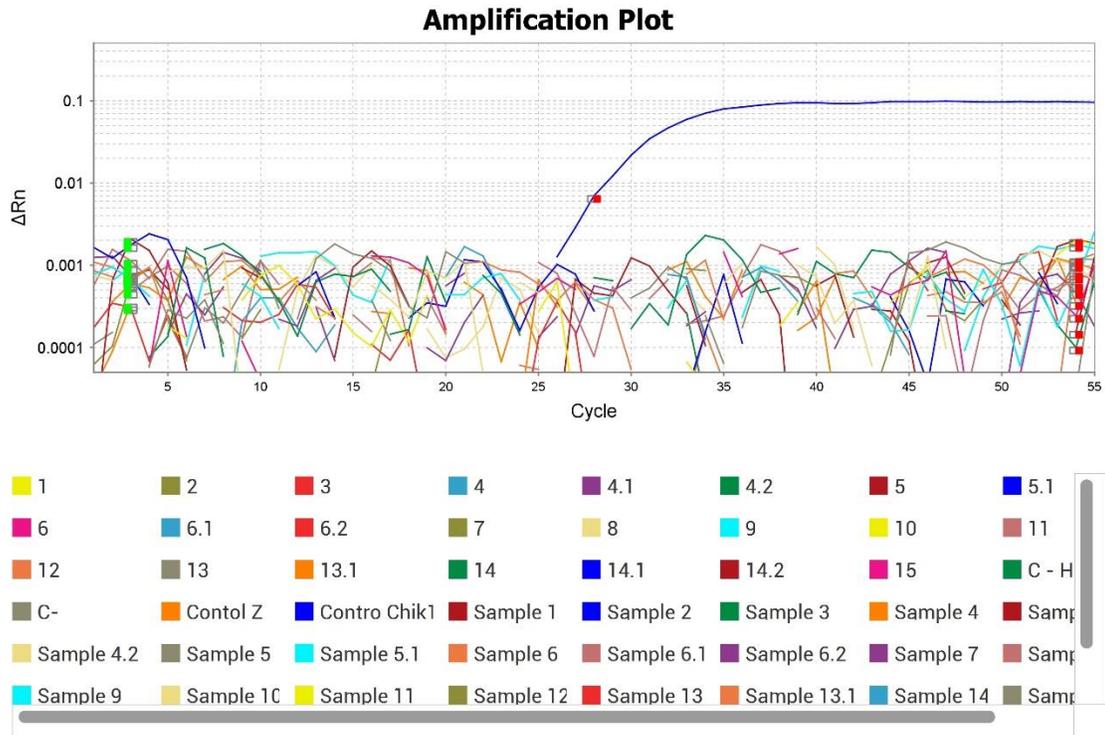


Figura 2. Resultados de los 23 grupos de larvas analizados por RT-qPCR para detección de CHIKV.

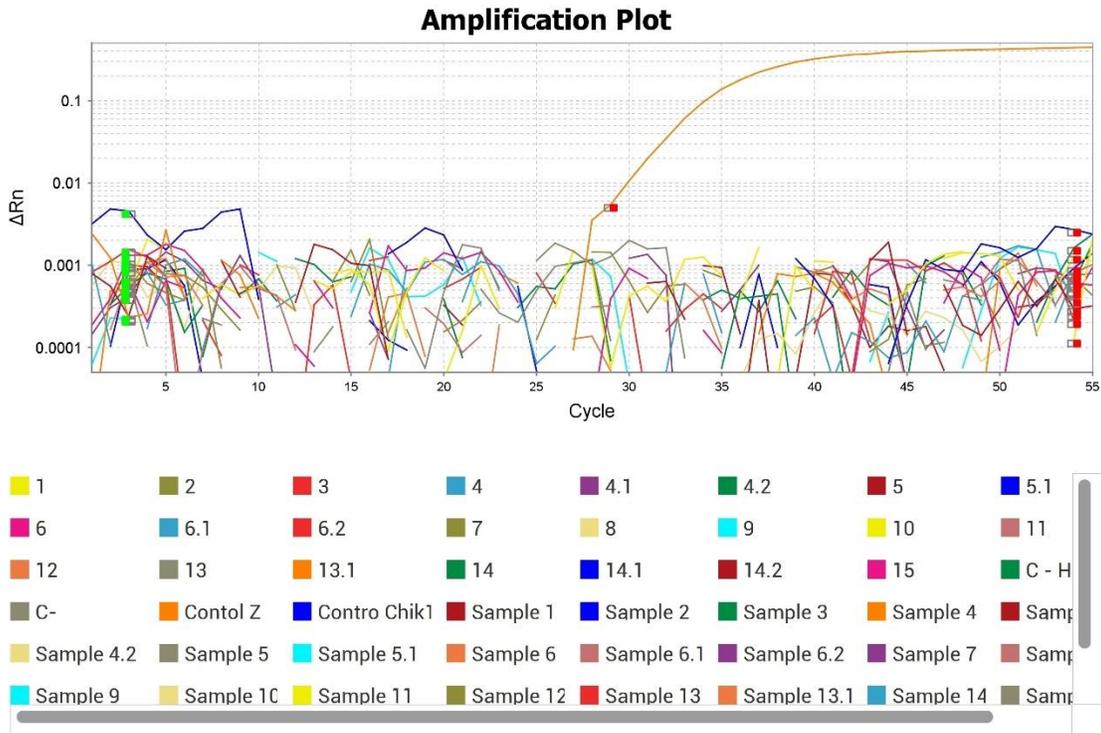


Figura 3. Resultados de los 23 grupos de larvas analizados por RT-qPCR para detección de ZIKV.

4. Discusión

La detección de *Ae. albopictus*, *Ae. aegypti*, *Culex corniger*, *Culex coronator*, *Culex interrogator*, *Culex nigripalpus*, *Culex quinquefasciatus* y *Limatus* spp. coincide con reportes previos, en los que además se determinó a *Ae. aegypti* como la especie más abundante (Calderón et al., 2009, Marín et al., 2009). Sin embargo, Calderón y colegas (2009) determinaron a *C. quinquefasciatus* como la segunda especie más frecuente y Marín y colegas (2009) a *Limatus durhami*, mientras que en el presente estudio se estableció a *Ae. albopictus* como la segunda especie más frecuente. Tanto *Culex* como *Limatus* son géneros considerados de importancia para la salud pública, ya que son culícidos hematófagos capaces de transmitir el virus del Nilo Occidental, siendo *C. quinquefasciatus* la principal especie de vector transmisor de ese virus (Retana et al., 2017). La vigilancia de culícidos se ha enfocado principalmente sobre los géneros *Aedes*, *Anopheles* y *Culex*, estudiándose su distribución geográfica y la implementación

de actividades de control, dejando de lado a *Limatus*, por su menor impacto epidemiológico en la transmisión de arbovirus (Hernández et al., 2018).

Los índices de diversidad son útiles para caracterizar una región, asociar la diversidad a factores socioambientales y planificar el control de vectores (Confalonieri & Costa, 2012). El presente estudio se realizó durante la estación lluviosa de Costa Rica y se determinó la riqueza específica e índices de diversidad, dando como resultado distritos con mayor o menor riqueza en comparación con los otros, así como diferencias en los índices entre cada distrito. Sin embargo, esta riqueza específica e índices pueden verse afectados durante la estación seca; tal como sucedió en una comunidad de San José, donde se vio una diferencia en las especies de culícidos encontrados en la estación seca donde se encontró *Ae. aegypti* y *Culex quinquefasciatus* en comparación con la estación lluviosa donde se encontró *Ae. aegypti*, *Culex quinquefasciatus*, *Culex restuans*, *Culex coronator* y *Limatus durhamii* (Calderón et al., 2004).

La razón por la que no se pudo detectar la presencia de arbovirus en las larvas *Ae. albopictus* puede deberse, por un lado, a la baja cantidad de larvas recolectadas (701 individuos, que se analizaron en 23 grupos), sumado a una recolecta no sistemática y a que solamente se logró recolectar larvas en solamente una localidad con brote activo de DENV y analizar 3 grupos de 35 larvas, mientras que las demás larvas se recolectaron en localidades con historia de brotes pasados. Así ocurrió en Brasil, en donde analizaron 1816 individuos (674 insectos adultos y 1142 larvas) y no lograron demostrar la presencia de DENV en *Aedes* spp. (Pinheiro, 2005). Tampoco se pudo detectar DENV y CHIKV en 442 larvas de *Ae. albopictus* capturadas sistemáticamente en una misma región de Brasil entre junio 2015 y abril 2016, pero se logró detectar la presencia de ZIKV en una muestra compuesta de 33 larvas, durante un gran brote que se presentó durante el periodo de la investigación (Maniero et al., 2019). Para lograr la detección del ZIKV los investigadores brasileños recolectaron en forma activa y sistemática los artrópodos durante 10 meses en una región, logrando detectar únicamente en un grupo de *Ae. albopictus* la presencia de ZIKV, mientras que en la presente investigación solamente se recolectaron los artrópodos en una localidad en una única fecha.

Se ha establecido que la transmisión transovárica o vertical efectiva es de un 0.6% a un 2% en experimentos, y de un 0.2% a 0.8% en forma natural, lo cual también reduce la probabilidad de encontrar larvas infectadas con arbovirus en forma natural. Otro posible factor puede ser atribuido al clima. Se ha reportado que la tasa de transmisión transovárica es mayor en climas áridos (Lequime et al., 2016), clima que no se encuentra en Costa Rica. Esto puede deberse a una adaptación de estos arbovirus para persistir en los climas menos favorables.

5. Conclusiones

- *Aedes aegypti* resultó ser la especie más abundante recolectada en la presente investigación, seguida de *Ae. albopictus*.
- Guácimo y La Virgen fueron los distritos con mayor riqueza de culícidos, encontrándose un total de seis especies, mientras que en Jacó, La Suiza y Pital únicamente se encontró *Ae. aegypti*.
- Pavones fue el distrito con mayor y Siquirres el distrito con menor equitatividad, diversidad y abundancia de especies.
- Se reporta por primera vez la presencia de larvas de *Ae. albopictus* (n=105) en la localidad de Punta Morales.
- Se reportaron especies de *Culex* y *Limatus* que son culícidos que podrían tener un papel importante en salud humana y animal.
- Los grupos de larvas de *Ae. albopictus* (n=23) resultaron negativos a DENV, CHIKV y ZIKV en qRT-PCR.

6. Recomendaciones

- Realizar estudios comparativos sobre índices de diversidad en estación lluviosa y seca para determinar diferencias en las poblaciones de mosquitos en ambas estaciones.
- Recolectar en localidades con brotes de dengue, chikungunya o Zika en forma robusta y sistemática larvas de *Ae. albopictus* para demostrar la transmisión vertical de los arbovirus.

- Investigar en forma experimental la transmisión transovárica de los arbovirus en *Ae. albopictus*, para determinar desde cuál estadio larval se pueden detectar estos virus y durante cuantas generaciones se pueden transmitir.

7. Referencias bibliográficas

Agarwal A, Dash PK, Singh AK, Sharma S, Gopalan N, Rao PVL, Parida MM & Reiter P. (2014) Evidence of Experimental Vertical Transmission of Emerging Novel ECSA Genotype of Chikungunya Virus in *Aedes aegypti*. PLoS Negl Trop Dis 8(7): e2990. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002990>

Arredondo-García, J. L., Méndez-Herrera, A., & Medina-Cortina, H. (2016). Arbovirus in Latin America. Acta pediátrica de México, 37(2), 111-131. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0186-23912016000200111

Calderón-Arguedas, O., Troyo, A., & Solano, M. E. (2004). Diversidad larval de mosquitos (Diptera: Culicidae) en contenedores artificiales procedentes de una comunidad urbana de San José, Costa Rica. *Parasitología latinoamericana*, 59(3-4), 132-136.

Calderón-Arguedas, O., Troyo, A., Solano, M. E., Avendaño, A., & Beier, J. C. (2009). Urban mosquito species (Diptera: Culicidae) of dengue endemic communities in the Greater Puntarenas area, Costa Rica. *Revista de biología tropical*, 57(4), 1223-1234.

Catenacci, L. S., & De Alcantara, B. N. (2019). Zika Virus. *Fowler's Zoo and Wild Animal Medicine Current Therapy*, Volume 9, 280–286. doi:10.1016/b978-0-323-55228-8.00041-2

Chomposri, J., Thavara, U., Tawatsin, A., Boonserm, R., Phumee, A., Sangkitporn, S., & Siriyasatien, P. (2016). Vertical transmission of Indian Ocean Lineage of chikungunya virus in *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* mosquitoes. *Parasites & vectors*, 9(1), 1-13. doi:<https://doi.org/10.1186/s13071-016-1505-6>

Confalonieri, U. E., & Costa Neto, C. (2012). Diversity of mosquito vectors (Diptera: culicidae) in caxiuana, Pará, Brazil. *Interdisciplinary perspectives on infectious diseases*, 2012. <https://doi.org/10.1155/2012/741273>

DeZure, A., & Graham, B. S. (2016). Vaccines for Emerging Viral Diseases. *The Vaccine Book*, 543–560. doi:10.1016/b978-0-12-802174-3.00028-x

Feldstein, L. R., Ellis, E. M., Rowhani-Rahbar, A., Halloran, M. E., & Ellis, B. R. (2016). The First Reported Outbreak of Chikungunya in the U.S. Virgin Islands, 2014-2015. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 95(4), 885–889. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.16-0288>

Fellner C. (2016). Zika in America: The Year in Review. *P & T : a peer-reviewed journal for formulary management*, 41(12), 778–791.

Ferreira de Lima, V. H., & Lima Camara, T. N. (2018). Natural vertical transmission of dengue virus in *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*: a systematic review. *Parasites & Vectors*, 11(1), 77. doi:10.1186/s13071-018-2643-9

Galán Huerta, K. A. (2013). Identificación y análisis de las variantes genómicas del virus del dengue y su asociación con la presentación clínica en una zona de baja y otra de alta endemicidad en México. Universidad Autónoma de Nuevo León,

Guo, X.-X., Li, C.-X., Zhang, Y.-M., Xing, D., Dong, Y.-D., Zhang, H.-D., Xing, D., Dong, Y.-D., Zhang, H.-D., Qin, C.-F & Zhao, T.-Y. (2016). Vector competence of *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) for the DEN2-FJ10 and DEN2-FJ11 strains of the dengue 2 virus in Fujian, China. *Acta tropica*, 161, 86-90. doi:<https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2016.05.018>

Gutiérrez Bugallo, G., Rodríguez Roche, R., Díaz Gutiérrez, G., Mendizábal Alcalá, M. E., Peraza Cuesta, I., Pérez Castillo, M., Vasquez Perera, A. A., Rodríguez Coto, M., Alvarez Vera, M., Bisset Lazco, J. A & Guzmán Tirado, M. G. (2018) Transmisión vertical de los virus del dengue en poblaciones cubanas de *Aedes aegypti*.

Gutiérrez-Bugallo, G., Piedra, LA, Rodríguez, M., Bisset, JA, Lourenço-de-Oliveira, R., Weaver, SC, ... y Vega-Rúa, A. (2019). Vector-borne transmission and evolution of Zika virus. *Nat Ecol Evol* **3**, 561–569. doi: <https://doi.org/10.1038/s41559-019-0836-z>

Hernández-Rodríguez, J. L., Granados-Echegoyen, C. A., Ortega-Morales, B. O., Ibáñez-Bernal, S., Pérez-Pacheco, R., Chan-Bacab, M., ... & Huerta-Jiménez, H. (2018). First record of *Limatus durhamii* Theobald (Diptera: Culicidae) in Campeche, Mexico. *Florida Entomologist*, 101(4), 712-715. <https://doi.org/10.1653/024.101.0414>

Khetarpal, N., & Khanna, I. (2016). Dengue Fever: Causes, Complications, and Vaccine Strategies. *Journal of Immunology Research*, 2016, 6803098. doi:10.1155/2016/6803098

Ledezma Acevedo, J. G., Rodríguez Cardenas, N., & Ureña Picado, J. (2018). Digital cartographic tools in surveillance of diseases transmitted by *Aedes* spp; Case in Costa Rica. *Revista Costarricense de Salud Pública*, 27(1), 87-101.

Lequime, S., Paul, R. E., & Lambrechts, L. (2016). Determinants of arbovirus vertical transmission in mosquitoes. *PLoS pathogens*, 12(5), e1005548. doi:<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005548>

Leydesdorff, L. (2008). On the normalization and visualization of author co-citation data: Salton's Cosine versus the Jaccard index. *Journal of the American Society for Information Science and Technology*, 59(1), 77-85. doi:<https://doi.org/10.1002/asi.20732>

Marín, R., del Carmen Marquetti, M., Álvarez, Y., Gutiérrez, J. M., & González, R. (2009). Species and breeding sites of mosquitoes (Diptera: culicidae) present in the urban area of the Huetar Atlántica region of Costa Rica. *Revista Biomédica*, 20(1), 15-23.

Martínez Fernández, L., & Torrado Navarro, Y. P. (2015). Fiebre Chikungunya. *Revista Cubana de Medicina*, 54(1), 74-96.

Maniero, V. C., Rangel, P. S. C., Coelho, L. M. C., Silva, C. S. B., Aguiar, R. S., Lamas, C. C., & Cardozo, S. V. (2019). Identification of Zika virus in immature phases of *Aedes*

aegypti and *Aedes albopictus*: a surveillance strategy for outbreak anticipation. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 52.

McKenzie, B. A., Wilson, A. E., & Zohdy, S. (2019). *Aedes albopictus* is a competent vector of Zika virus: A meta-analysis. *PloS one*, 14(5), e0216794. doi:<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0216794>

Ministerio de Salud de Costa Rica. (2020). Analisis de situacion de salud: Boletin epidemiologico Dengue, Chikungunya y Zika. Retrived from: <https://www.ministeriodesalud.go.cr/index.php/vigilancia-de-la-salud/analisis-de-situacion-de-salud>

Ministerio de Salud de Costa Rica. (2019). Boletín epidemiológico mensual Semana epidemiológica 46 <https://www.ministeriodesalud.go.cr/index.php/vigilancia-de-la-salud/boletines/4519-boletin-epidemiologico-mensual-semana-epidemiologica-46/file>

Moreno, C. E. (2000). *Métodos para medir la biodiversidad. Volumen 1. Manuales y tesis SEA*.

Morris, E. K., Caruso, T., Buscot, F., Fischer, M., Hancock, C., Maier, T. S., Meiners, T., Muller, C., Obermaier, E., Prati, D., Cocher, S. A., Sonnemann, I., Waschke, N., Wubet, T., Wurst, S. & Rillig, M. C. (2014). Choosing and using diversity indices: insights for ecological applications from the German Biodiversity Exploratories. *Ecology and evolution*, 4(18), 3514-3524. <https://doi.org/10.1002/ece3.1155>

Pinheiro, V., Tadei, W. P., Barros, P. M., Vasconcelos, P. F., & Cruz, A. C. R. (2005). Detection of dengue virus serotype 3 by reverse transcription-polymerase chain reaction in *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae) captured in Manaus, Amazonas. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 100(8), 833-839.

Plourde, A. R., & Bloch, E. M. (2016). A Literature Review of Zika Virus. *Emerging Infectious Diseases*, 22(7), 1185-1192. <https://doi.org/10.3201/eid2207.151990>

Quanquin, N., Adachi, K., & Nielsen-Saines, K. (2020). Zika virus. *Maternal Immunization*, 289–319. doi:10.1016/b978-0-12-814582-1.00014-0

Retana-Salazar, A. P., Rodríguez-Arrieta, A., & Barrientos-Segura, A. (2017). El virus de nilo occidental y sus vectores: reseña histórica, biología y ecología de *Aedes albopictus*, *Culex pipiens* y *Cx. quinquefasciatus*. *Revista Costarricense de Salud Pública*, 26(2), 99-141

Rossi, G. C., & Almirón, W. R. (2004). Clave ilustrada para la identificación de larvas de mosquitos de interés sanitario encontradas en criaderos artificiales en la Argentina. *Publicaciones Mundo Sano, Serie Enfermedades Transmisibles*, 5, 53.

Roossinck, M. (2020). *Virus 101 Incredible Microbes from Coronavirus to Zika*. London, United Kingdom: Ivy Press.

Rueda, L. M. (2004). Pictorial keys for the identification of mosquitoes (Diptera: Culicidae) associated with dengue virus transmission. *Walter Reed Army Inst Of Research Washington Dc Department Of Entomology*.

Sanchez, F., Barboza, L. A., Burton, D., & Cintrón-Arias, A. (2018). Comparative analysis of dengue versus chikungunya outbreaks in Costa Rica. *Ricerche di Matematica*, 67(1), 163-174. <https://doi.org/10.1007/s11587-018-0362-3>

Sim, S., & Hibberd, M. L. (2016). Genomic approaches for understanding dengue: insights from the virus, vector, and host. *Genome Biology*, 17(1), 38. doi:10.1186/s13059-016-0907-2

Thangamani, S., Huang, J., Hart, C. E., Guzman, H., & Tesh, R. B. (2016). Vertical Transmission of Zika Virus in *Aedes aegypti* Mosquitoes, *The American Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 95(5), 1169-1173. doi: <https://doi.org/10.4269/ajtmh.16-0448>

Trejos, A. M., Rodríguez, R. M., & Ávila-Agüero, M. L. (1999). El dengue en Costa Rica. *Acta Médica Costarricense*, 41(2).

Waggoner, J. J., Gresh, L., Mohamed-Hadley, A., Ballesteros, G., Davila, M. J. V., Tellez, Y., . . . Pinsky, B. A. (2016). Single-reaction multiplex reverse transcription PCR for detection of Zika, chikungunya, and dengue viruses. *Emerging infectious diseases*, 22(7), 1295. doi:<https://dx.doi.org/10.3201/eid2207.160326>.

ARTÍCULO II

Haplotipos de larvas *Aedes albopictus* en Costa Rica identificadas mediante secuenciación del gen citocromo oxidasa I

Resumen

Aedes albopictus se conoce como vector biológico de más de 26 virus, entre ellos el virus dengue, virus chikungunya y Zika virus. Las estrategias de control de estos vectores incluyen la aplicación de insecticidas y la eliminación de los criaderos, sin embargo, estudios de vigilancia genética de las especies de *Aedes* brindan información sobre dispersión y dinámica poblacional, lo que puede ser utilizado para diseñar estrategias de control de estos vectores. El objetivo del presente trabajo fue investigar la diversidad de haplotipos de *Aedes albopictus* en diferentes distritos de Costa Rica. Se recolectaron y clasificaron taxonómicamente las larvas de *Ae. albopictus* en 19 distritos, seguidamente una larva por distrito se sometió a extracción de ADN y análisis molecular (reacción en cadena de la polimerasa convencional del gen mitocondrial de la citocromo oxidasa I y secuenciación). *Aedes albopictus* se encontró en 11 de 19 distritos muestreados. Se determinaron cinco variantes genéticas, los haplotipos H3, H6, H26, H37 y H67, la presencia de tres haplotipos (H3, H6 y H26) se reporta por primera vez en Costa Rica. Estos haplotipos se encontraron cada uno solamente en un distrito, mientras que los otros dos haplotipos (H37 y H67), ya reportados previamente, se encontraron en diferentes distritos. El haplotipo más frecuente fue el H67, que se encontró en cinco distritos, mientras que el H37 se encontró en tres distritos. Los haplotipos presentaron entre tres ($n=1$) y seis ($n=5$) sitios polimórficos, dos de los sitios polimórficos (40 y 94) afectan la secuencia de los aminoácidos. El árbol filogenético estableció cinco clados bien definidos. Los haplotipos encontrados, presentaron una estrecha relación entre sí, observándose una diferencia moderada entre los haplotipos reportados anteriormente (H67 y H37) y los nuevos haplotipos (H3 y H26), y una diferencia significativa entre los haplotipos reportados anteriormente y el haplotipo 6. Se recomienda realizar estudios sistemáticos de haplotipos de *Ae. albopictus* con un mayor número de muestras por distrito o localidad y en diferentes estaciones climáticas e investigar si los haplotipos más abundantes son resistentes a insecticidas o si presentan una transmisión transovárica más efectiva.

Abstract

Aedes albopictus is known as a biological vector for more than 26 viruses, including dengue virus, chikungunya virus, and Zika virus. The control strategies of these vectors include the application of insecticides and the elimination of breeding sites; however, genetic surveillance studies of *Aedes* species provide information on dispersion and population dynamics, which can be used to design control strategies for these vectors. The objective of this investigation was to investigate the diversity of *Ae. albopictus* haplotypes in different districts of Costa Rica. Larvae of *Ae. albopictus* were collected in 19 districts, taxonomically classified, then one larva per district underwent DNA extraction and molecular analysis (standard polymerase chain reaction amplifying the mitochondrial cytochrome oxidase I gene and sequencing). *Aedes albopictus* was found in 11 of 19 districts sampled. Five genetic variants were determined, the H3, H6, H26, H37 and H67 haplotypes, the presence of three haplotypes (H3, H6 and H26) is reported for the first time in Costa Rica. Latter were found each only in one district, while the other two haplotypes (H37 and H67), were reported previously and found in different districts. The most frequent haplotype was H67, that was found in five districts, whereas H37 was found in three districts. The haplotypes presented between three (n=1) and six (n=5) polymorphic sites, two of the polymorphic sites (40 and 94) affect the amino acid sequence. The phylogenetic tree established five well defined clades. The haplotypes found were closely related to each other, observing a moderate difference between the previously reported haplotypes (H67 and H37) and the new haplotypes (H3 and H26), and a significant difference between the previously reported haplotypes and haplotype 6. It is recommended to carry out systematic studies of *Ae. albopictus* haplotypes with a higher number of samples per district or locations, and in different climatic seasons, and to investigate whether the most abundant haplotypes are resistant to insecticides or if they present a more effective transovarial transmission.

1. Introducción

Existen aproximadamente 3500 especies de mosquitos que ocupan casi todos los continentes del mundo, excepto el Antártico. Algunas de estas especies son peligrosas, ya que son capaces de transmitir enfermedades (Aguirre & Navarro, 2017; Alshehri & Saeed, 2013). El mosquito *Aedes albopictus* pertenece a la Familia Culicidae del Orden

Diptera, y se conoce como vector biológico de más de 26 virus, entre estos virus de dengue, virus de chikungunya y Zika virus, por lo que se considera una especie de importancia para la salud pública (McKenzie et al., 2019). Estos arbovirus permanecerán en el mosquito y se transmitirán a través de picaduras durante toda su vida (Sim & Hibberd, 2016). Aproximadamente dos quintas partes de la población mundial están en riesgo de contraer una infección por dengue y se estima que anualmente 500.000 personas se ven afectadas por la enfermedad hemorrágica con tasas de mortalidad que llegan a superar el 20% (Guo et al., 2016; Hemme et al., 2010). El virus chikungunya también puede presentarse con síntomas hemorrágicos, y ocasionar meningoencefalitis y miocarditis (Arredondo et al., 2016; Martínez & Torrado, 2015), mientras que Zika cursa con fuertes dolores articulares, síndrome de Guillain-Barré y anomalías congénitas como la microcefalia (Plourde & Bloch 2016).

Las estrategias tradicionales para el control de los vectores que transmiten arbovirosis generalmente incluyen la aplicación de insecticidas y la eliminación de los recipientes con agua que son hábitats favorables para que se produzca la oviposición de los mosquitos (Marín et al., 2014; Zheng et al., 2018). Actualmente, también se han considerado nuevas medidas de control, como la técnica de insectos estériles y el reemplazo de la población con mosquitos transgénicos incompetentes para transmitir el virus. El objetivo de los programas de control de *Aedes* es reducir la densidad de población de mosquitos adultos por debajo de un umbral crítico donde es poco probable que se produzca la transmisión epidémica (Hemme et al., 2010). En Costa Rica, el Ministerio de Salud utiliza insecticidas piretroides como deltametrina y cipermetrina y organofosforados como temefós en las campañas de fumigación (Calderón et al., 2018). Para las estrategias de control es importante un conocimiento integral del vector, incluyendo la variación genética de las poblaciones de artrópodos vectores como el *Ae. albopictus*, y determinar su distribución o dispersión, que ayuda a entender las dinámicas poblacionales.

Los estudios de variación genética en especies de *Aedes* se han basado en estudiar varias regiones del ADN mitocondrial. Los genes más estudiados en *Ae. albopictus* han sido la región control (D-loop), la Citocromo Oxidasa I (COI), la Nicotina Adenina

Deshidrogenasa Subunidad 5 (ND5) y la Nicotina Adenina Deshidrogenasa Subunidad 4 (ND4) (Heredia, 2013; Mousson et al., 2005). El gen mitocondrial COI es uno de los genes más conservados, pocas veces se recombina, lo que refleja una evolución lineal o clonal, además de que muestra una tasa de evolución relativamente rápida, por lo que se considera un gen ideal para estudiar la diversidad genética y la propagación de *Aedes* (Futami et al., 2015).

Los primeros estudios genéticos de poblaciones de *Ae. albopictus* indicaron que las poblaciones se agrupaban por continentes o países, según donde fueran recolectadas, presentando poca variación genética entre las poblaciones (Black et al., 1988; Kambhampati et al., 1991; Oliveira et al., 2003). Sin embargo, estudios más recientes han establecido diferencias genéticas (haplotipos) en poblaciones de *Ae. albopictus* en un mismo continente o país (Gupta & Preet, 2014; Kamgang et al., 2013; Usmani et al., 2009). Se habla de haplotipos, cuando se encuentran variaciones del ADN a lo largo de un cromosoma, o polimorfismos, que suelen ser heredados juntos, generalmente se trata de una combinación de alelos o un conjunto de polimorfismos de nucleótido sencillo (SNPs) que se encuentran en el mismo cromosoma (Rodríguez et al., 1998).

Los estudios de la genética de poblaciones y de la filogenia molecular de artrópodos vectores de enfermedades como *Aedes* brindan información sobre patrones de dispersión y dinámica poblacional (potencial para propagar patógenos) de una especie (Araya et al., 2015; Gupta & Preet, 2014). Estudios realizados en Italia que determinaron diferentes haplotipos lograron asociar estos haplotipos a zonas tropicales o regiones templadas/subtropicales (Shaikevich & Talbalaghi, 2013). En ese sentido en Camerun se determinó, que las poblaciones de *Ae. albopictus* encontradas en su parte de su territorio estaban relacionadas a zonas tropicales externas y no a su zonas templadas o subtropicales (Kamgang et al., 2011).

Conocer la variabilidad genética puede contribuir al diseño de estrategias de control de estos vectores (Artigas et al., 2021; Mousson et al., 2005; Naim et al., 2020; Yang et al., 2021). En Costa Rica solamente se ha realizado una única investigación sobre la diversidad de *Ae. albopictus* en una población de mosquitos adultos en el distrito de La Virgen, Sarapiquí. En ese estudio se encontró una alta diversidad, encontrándose siete

haplotipos (Futami et al., 2015). Sin embargo, se desconocen los haplotipos presentes en otras regiones del país. Este estudio tuvo como objetivo investigar la diversidad de haplotipos de *Aedes albopictus* presentes en 19 distritos de Costa Rica, utilizando el marcador de ADN mitocondrial Citocromo Oxidasa I.

2. Materiales y Método

2.1 Tipo de estudio y muestra

Se realizó un estudio de tipo transversal y descriptivo, en el cual se analizaron larvas de *Ae. albopictus* de todos los estadios (L1-L4), las cuales fueron recolectadas en colaboración con la Dirección de Vigilancia de Vectores del Ministerio de Salud entre agosto y noviembre de 2021. Las larvas se recolectaron en 26 localidades de 19 distritos, en donde se muestrearon calles, aceras y playas (seleccionadas al azar), y en las que se recolectaron todas las larvas de mosquitos encontradas en criaderos como llantas, cubetas, chatarra, etc. Las larvas se recolectaron volcando el contenido de los criaderos y filtrando con un colador de malla fina el agua, luego introduciendo las larvas en un frasco plástico con agua y tapa. En los casos de criaderos de gran tamaño o imposibles de mover se capturaron las larvas pasando el colador por la parte más superficial del recipiente o con ayuda de pipetas plásticas de Pasteur. Las larvas se colocaron en recipientes con agua según la localidad y se transportaron vivas al laboratorio, donde se procedió a identificarlas inmediatamente.

2.2 Identificación de las larvas

La identificación taxonómica de las larvas de *Ae. albopictus* se realizó utilizando las claves morfológicas descritas por Rueda (2004), visualizando el tórax y el octavo segmento abdominal mediante estereoscopio y una vez identificadas, se seleccionó y separó un individuo de cada distrito y se congeló a -80°C hasta ser sometidos a extracción de ADN.

2.3 Extracción de ADN

Las larvas se sometieron a extracción de ADN mediante el kit QIAamp DNA Mini Kit siguiendo los pasos recomendados por el fabricante. Posterior a las extracciones, el ADN extraído se midió con el NanoDrop One de Thermo Scientific para conocer la

calidad y cantidad de ADN, posteriormente se almacenaron a -20°C hasta su análisis mediante la prueba molecular.

2.4 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Para determinar los haplotipos de *Ae. albopictus* se realizó un PCR convencional en el que se amplificó un fragmento de 1390 pb del gen mitocondrial de la Citocromo Oxidasa I según el protocolo descrito por Futami et al., (2015). La mezcla de cada PCR contenía 25 µl DreamTaq DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific), 18.5 µl de agua grado biología molecular (Thermo Scientific), 2 µl de cada cebador: albo1454F (5' GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG 3') y albo2160R (5' TAAACTTCTGGATGACCAAAAAATCA 3'); albo2027F (5' CCCGTATTAGCCGGAGCTAT 3') y albo2886R (5' ATGGGGAAAGAAGGAGTTTCG 3') y 2.5 µl de ADN. Las condiciones del termociclador fueron: una desnaturalización inicial de 94 °C durante 3 min, seguida de 35 ciclos de 94 °C durante 30 s, 55 °C durante 30 s, 72 °C durante 1 min y luego extensión final a 72 °C durante 6 min (ThermoScientific, USA). Para confirmar la amplificación, todas las muestras se sometieron a electroforesis en gel de agarosa con GelRed al 1%, las bandas se visualizaron con un transiluminador ultravioleta.

2.5 Secuenciación y análisis de haplotipos

Los productos amplificados en el PCR fueron enviados a la compañía Macrogen en Seúl, Corea del Sur, para su secuenciación. Las secuencias obtenidas fueron editadas con el programa BioEdit 7.2.5, se efectuó un alineamiento múltiple y se compararon con las secuencias disponibles en la base de datos de GenBank, donde se verificó que correspondían a la especie *Ae. albopictus* con un porcentaje de similitud mayor al 99%, mediante la utilización del programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) de NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). El programa MEGA 10.1.8 se utilizó para determinar las secuencias de aminoácidos y hacer el árbol filogenético.

2.6 Recolecta de datos y mapa

En una base de datos se anotó la siguiente información de los lugares en los que se encontró larvas de *Ae. albopictus*; fecha de recolecta, provincia, cantón, distrito, localidad, coordenadas y resultado del análisis molecular para haplotipos de cada una

de las larvas *Ae. albopictus*. Con el uso de QGIS versión 3.16.0 se realizó un mapa de la distribución de los haplotipos encontrados según sus coordenadas.

3. Resultados

Ae. albopictus se encontró en 11 de 19 distritos muestreados (Cuadro 1). Del total de las 11 larvas analizadas se determinaron cinco variantes genéticas, los haplotipos H3, H6, H26, H37 y H67 (Cuadro 2). Tres haplotipos se encontraron cada uno solamente en un distrito (H3 en San Isidro de El General, H6 en Daniel Flores y H26 en La Virgen), mientras que los otros dos haplotipos (H37 y H67) se encontraron en diferentes distritos. El haplotipo más abundante fue el H67, que se encontró en cinco distritos (Puerto Viejo, El Cairo, Guácimo, Guápiles y Rita), y H37, que se encontró en tres distritos (Buenos Aires, Chomes y Tárcoles) (Figura 1).

Cuadro 1. Coordenadas geográficas de los 11 distritos con larvas *Ae. albopictus* que se sometieron al análisis de haplotipos en Costa Rica, 2021.

Distrito	Localidad	Haplotipo	Coordenada geográfica	
			Longitud	Latitud
Buenos Aires	Buenos Aires	H37	-83,20433095	9,94525923
Daniel Flores	Concepción	H6	-83,683834	9,37194
San Isidro de El General	San Isidro de El General	H3	-83,708781	9,374551
Chomes	Punta Morales	H37	-84,945572	10,072762
Tárcoles	Playa Azul	H37	-84,633717	9,775853
Puerto Viejo	Naranjal 2	H67	-83,986452	10,452357
La Virgen	La Chilera	H26	-84,61087272	10,26541003
El Cairo	El Cairo	H67	-83,532904	10,119598
Guácimo	Afriquita	H67	-83,40100308	10,12903569
Guápiles	Los Diamantes	H67	-83,774632	10,211391
Rita	Rita	H67	-83,776214	10,265982

Cuadro 2. Haplotipos de larvas *Ae. albopictus* encontrados en diferentes distritos de Costa Rica, código de acceso y países con reportes de los haplotipos del gen COI de *Ae. albopictus* encontrados en Costa Rica.

Distrito	Haplotipo	Referencia GenBank	País	Identidad nucleotídica	Porcentaje de identidad (%)
San Isidro de El General	H3	KC690898.1	Japón Guangzhou Xiamen Jiangsu Taiwan Italia Los Angeles Hawaii	1390/1390	100%
Daniel Flores	H6	KX886307.1	China	542/542	100%
La Virgen	H26	KC690921.1	Singapur	1390/1390	100%
Buenos Aires, Chomes y Tárcoles	H37*	KC690932.1	Italia New Jersey Texas Costa Rica Panamá	1317/1317	100%
Puerto Viejo, El Cairo, Guácimo, Guápiles y Rita	H67*	AB907796.1	Costa Rica	1390/1390	100%

*Ya reportado en Sarapiquí en 2015.

Los haplotipos H3, H26, H37 y H67 presentaron 1 sitios polimórficos en sus secuencias, mientras que el haplotipo H6 mostró solo 2 sitios polimórficos (Cuadro 3). Se estableció que los sitios polimórficos en la posición 40 y 94 afectan la secuencia de los aminoácidos. En la posición 40 el H6 codifica para una fenilalanina mientras que el resto de los haplotipos codifica para una isoleucina, y en la posición 94, el H67 codificó para una isoleucina mientras que el resto codifica para valina (Cuadro 4). El árbol

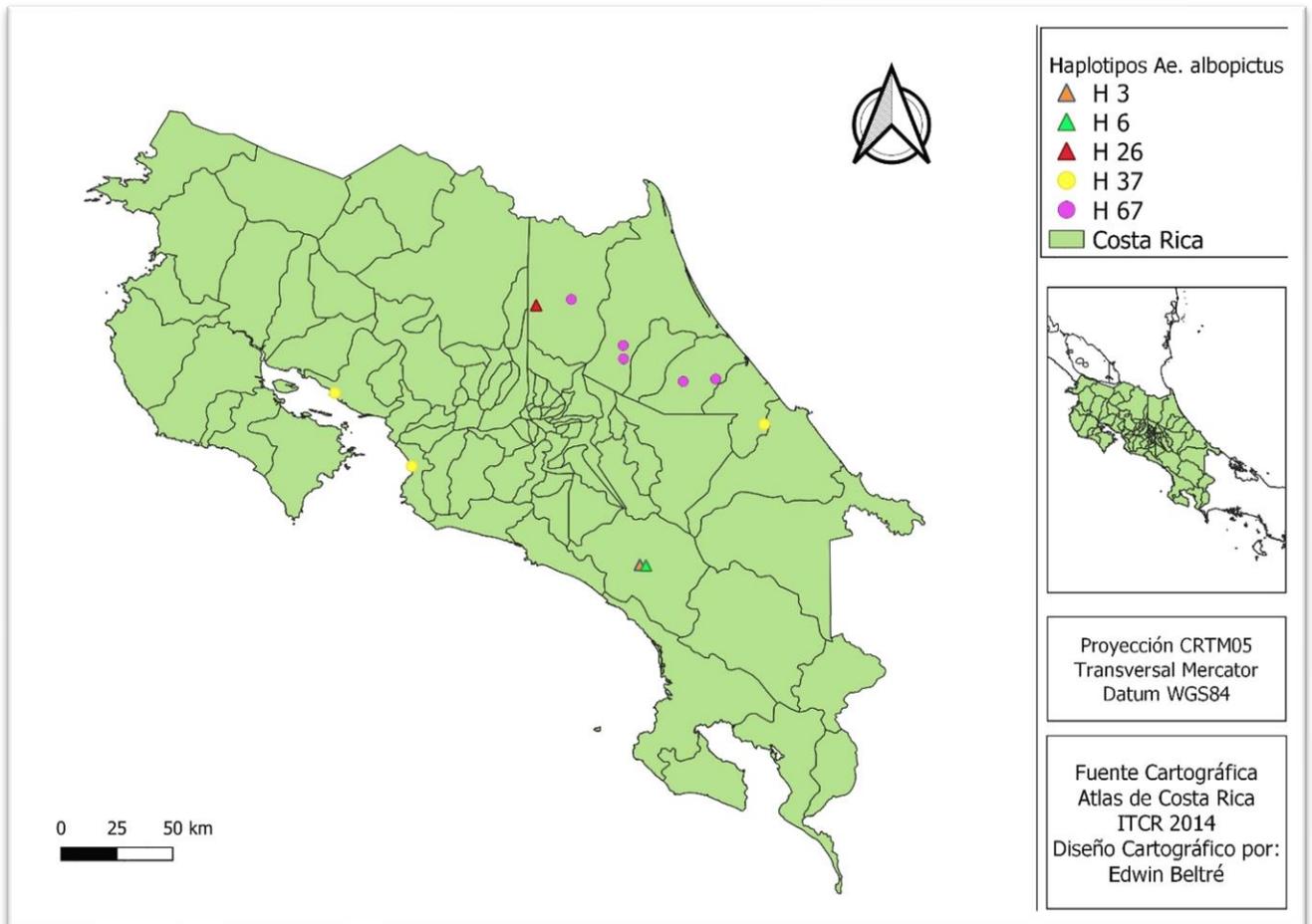
filogenético basado en la secuencia del gen COI I estableció cinco clados bien definidos, otorgándole un clado a cada haplotipo encontrado (Figura 2).

Cuadro 3. Sitios polimórficos de los cinco haplotipos (H3, H6, H26, H37 y H67) de larvas *Ae. albopictus* de Costa Rica, encontrados en las secuencias del gen COI.

Haplotipo	Posición de polimorfismo					
	40	94	467	954	1140	1404
H3	A	G	T	A	C	G
H6	T	G	C	-	-	-
H26	A	G	T	A	T	A
H37	A	G	T	G	T	G
H67	A	A	T	A	T	G

Cuadro 4. Sitios de cambios de aminoácidos de los cinco haplotipos (H3, H6, H26, H37 y H67) de larvas *Ae. albopictus* de Costa Rica, encontrados en las secuencias del gen COI.

Haplotipo	Posición de cambio en aminoácidos	
	40	94
H3	Isoleucina	Valina
H6	Fenilalanina	Valina
H26	Isoleucina	Valina
H37	Isoleucina	Valina
H67	Isoleucina	Isoleucina



(Δ) Haplotipos nuevos en Costa Rica y (●) Haplotipos con reportes previos en Costa Rica.

Figura 1. Mapa de distribución de los haplotipos de *Ae. albopictus* encontrados en Costa Rica.

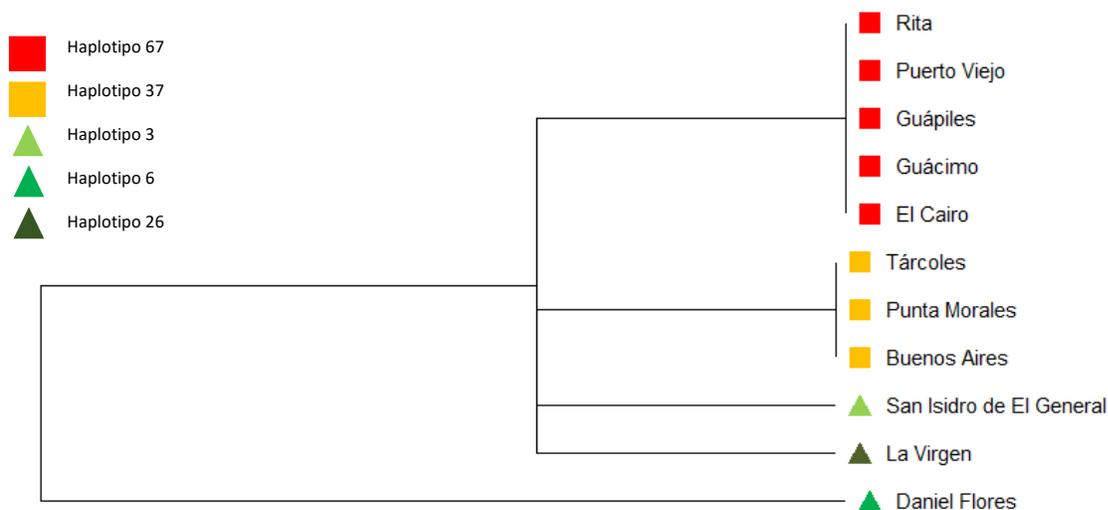


Figura 2. Árbol filogenético de los haplotipos de *Ae. albopictus* encontrados en Costa Rica, basados en la secuencia del gen COI y generado mediante el uso de MEGA 10.1.8. (□) Haplotipos con reportes previos en Costa Rica. (Δ) Haplotipos de nuevo reporte en Costa Rica

4. Discusión

En el presente trabajo se encontraron por primera vez tres haplotipos de *Ae. albopictus* no reportados con anterioridad en Costa Rica, cada uno de estos haplotipos fue encontrado solamente en un distrito. Dos de estos nuevos haplotipos se encontraron en el sur del país, y habían sido reportados con anterioridad en Asia, Europa y América del Norte (H6 en China y H3 en Japón, China, Italia, Los Angeles y Hawaii), mientras que el tercer nuevo haplotipo (H26) se encontró en el norte del país, y había sido reportado con anterioridad en Singapur. Los dos haplotipos restantes (H37 y H67), ya se habían reportado con anterioridad en el distrito La Virgen en Sarapiquí (Futami et al., 2015). H37 se encontró distribuido en la zona Pacífica y Atlántica del país, mientras que H67 fue el que más ampliamente se encontró distribuido, sin embargo, solamente en la zona atlántica. Los hallazgos en el presente trabajo concuerdan con Futami y colaboradores (2015) que también encontraron alta diversidad de haplotipos de *Ae. albopictus* en Sarapiquí, 7 haplotipos en total (H17, H37, H67, H68, H69, H70 y H71). En el presente estudio se encontró un haplotipo adicional no reportado en Sarapiquí, el H26, que puede deberse a un cambio en la población a través del tiempo. Como se

estableció en estudios realizados en Medellín, Colombia, donde determinaron en tres barrios y dos periodos (enero-abril 2010 y octubre-diciembre 2012) diferentes haplotipos (Cadavid et al., 2015), concluyendo que la composición genética cambió sin un patrón predecible en un periodo no mayor de dos años. Sin embargo, también puede deberse al tipo de estudio, que no fuera sistemático.

En el presente trabajo también se encontró alta diversidad de haplotipos, en concordancia con Futami y colaboradores (2015), aunque no se encontró tan alta diversidad en un solo distrito, debido al diseño del estudio, que solamente contempló investigar una larva por distrito, por limitaciones económicas. Sin embargo, con las limitaciones del estudio se pudo detectar haplotipos no reportados antes en el país y distribuidas en diversas regiones.

Se recomienda realizar estudios sistemáticos con múltiples larvas de cada distrito en temporada de sequía y de lluvia, para determinar los haplotipos presentes en las diferentes estaciones, lo que ayudaría a entender la diversidad, la velocidad de propagación y el flujo genético de las poblaciones naturales.

5. Conclusiones

- Se encontró un total de cinco haplotipos (H3, H6, H26, H37 y H67) en once distritos de Costa Rica.
- Los haplotipos H3, H6 y H26 se encontraron en un solo distrito cada uno (H3 en San Isidro de El General, H6 en Daniel Flores y H26 en La Virgen) y no habían sido reportados con anterioridad en el país.
- Los restantes dos haplotipos se encontraron en diferentes distritos y habían sido reportados con anterioridad en Sarapiquí, así se encontró H67 en cinco distritos de Costa Rica (Puerto Viejo, El Cairo, Guácimo, Guápiles y Rita) y H37 en tres distritos de Costa Rica (Buenos Aires, Chomes y Tárcoles).
- Todos los haplotipos encontrados presentaron más de un polimorfismo en su secuencia, los polimorfismos en las posiciones 40 y 94 afectan la secuencia de los aminoácidos.

6. Recomendaciones

- Realizar estudios sistemáticos de haplotipos de *Ae. albopictus* y con un mayor número de muestras por distrito o localidad y en diferentes estaciones climáticas.
- Investigar si los haplotipos más abundantes son resistentes a insecticidas y si presentan una transmisión transovárica de arbovirus más efectiva.

7. Referencias bibliográficas

Aguirre-Obando AO, & Navarro-Silva MA. (2017). How much is known about the genetic diversity of the Asian tiger mosquito? A systematic review. *Rev Univ Ind Santander Salud.* 2017; 49(3): 422-437. doi: <http://dx.doi.org/10.18273/revsal.v49n3-2017001>

Alshehri, M. S. A., & Saeed, M. (2013). Dengue fever outbreak and its relationship with climatic factors. *World Applied Sciences Journal*, 22(4), 506-515.

Araya-Anchetta, A., Busch, J. D., Scoles, G. A., & Wagner, D. M. (2015). Thirty years of tick population genetics: a comprehensive review. *Infection, Genetics and Evolution*, 29, 164-179. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2014.11.008>

Arredondo-García, J. L., Méndez-Herrera, A., & Medina-Cortina, H. (2016). Arbovirus in Latin America. *Acta pediátrica de México*, 37(2), 111-131. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0186-23912016000200111

Artigas, P., Reguera-Gomez, M., Valero, MA, Osca, D., da Silva Pacheco, R., Rosa-Freitas, MG, Fernandes Silva-do-Nascimento, T., Paredes-Esquivel, C., Lucientes, J., Mas-Coma, S., & Bargues, MD (2021). *Aedes albopictus* diversity and relationships in south-western Europe and Brazil by rDNA/mtDNA and phenotypic analyses: ITS-2, a useful marker for spread studies. *Parasites & Vectors*, 14(1), 1-23. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13071-021-04829-9>

Black, W. C., 4th, Hawley, W. A., Rai, K. S., & Craig, G. B., Jr (1988). Breeding structure of a colonizing species: *Aedes albopictus* (Skuse) in peninsular Malaysia and Borneo. *Heredity*, 61 (Pt 3), 439–446. <https://doi.org/10.1038/hdy.1988.136>

- Cadavid, J. M., Rúa, G., Campo, O., Bedoya, G., & Rojas, W. (2015). Cambios genéticos temporales y microgeográficos de *Aedes aegypti* en Medellín, Colombia. *Biomédica*, 35(1), 53-61. doi: <http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v35i1.2343>
- Calderón Arguedas, Ó., Vargas, K., & Troyo, A. (2018). Resistencia a insecticidas en cepas de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) de tres distritos de la Región Pacífico Central de Costa Rica. *Revista Cubana de Medicina Tropical*, 70, 1-9.
- Futami, K., Valderrama, A., Baldi, M., Minakawa, N., Marin Rodriguez, R., & Chaves, L. F. (2015). New and common haplotypes shape genetic diversity in Asian tiger mosquito populations from Costa Rica and Panamá. *Journal of economic entomology*, 108(2), 761-768.
- Guo, X.-X., Li, C.-X., Zhang, Y.-M., Xing, D., Dong, Y.-D., Zhang, H.-D., Qin, C.-F & Zhao, T.-Y. (2016). Vector competence of *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) for the DEN2-FJ10 and DEN2-FJ11 strains of the dengue 2 virus in Fujian, China. *Acta tropica*, 161, 86-90. doi:<https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2016.05.018>
- Gupta S, Preet S. (2014) Genetic differentiation of invasive *Aedes albopictus* by RAPD-PCR: implications for effective vector control. *Parasitol Res.* 2014; 113(6): 2137-2142. DOI: 10.1007/s00436-014-3864-2
- Hemme, R., Thomas, C., Chadee, D., & Severson, D. (2010). Influence of Urban Landscapes on Population Dynamics in a Short-Distance Migrant Mosquito. doi:<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000634>
- Heredia Chucatin, C., & Lira, R. (2013) Caracterización de haplotipos del gen mitocondrial nd4 en poblaciones de *aedes aegypti* (vector del dengue) de las comunidades de san Borja y Caranavi (Doctoral dissertation)
- Kambhampati, S., Black, W. & Rai, K. (1991). Geographic origin of the US and Brazilian *Aedes albopictus* inferred from allozyme analysis. *Heredity* 67, 85–94. <https://doi.org/10.1038/hdy.1991.67>

Kamgang B, Ngoagouni C, Manirakiza A, Nakouné E, Paupy C, Kazanji M. (2013). Temporal patterns of abundance of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) and mitochondrial DNA analysis of *Ae. albopictus* in the Central African Republic. *PLoS Negl Trop Dis.* 2013 Dec 12;7(12):e2590. doi: 10.1371/journal.pntd.0002590

Kamgang B, Brengues C, Fontenille D, Njiokou F, Simard F, Paupy C (2011) Genetic Structure of the Tiger Mosquito, *Aedes albopictus*, in Cameroon (Central Africa). *PLoS ONE* 6(5): e20257. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0020257>

Marín, R., del Carmen Marquetti, M., Álvarez, Y., Gutiérrez, J. M., & González, R. (2009). Especies de mosquitos (Diptera: Culicidae) y sus sitios de cría en la Región Huetar Atlántica, Costa Rica. *Revista Biomédica*, 20(1), 15-23.

Marín Rodríguez, R., Díaz Ríos, M., Álvarez Gutiérrez, Y., & Calderón Arguedas, O. (2014). Sitios de cría de *Aedes aegypti* (Linnaeus) y distribución geográfica de *Aedes albopictus* (Skuse) en la provincia de Limón, Costa Rica. 2012. *Revista Cubana de Medicina Tropical*, 66(2), 219-227.

Martínez Fernández, L., & Torrado Navarro, Y. P. (2015). Fiebre Chikungunya. *Revista Cubana de Medicina*, 54(1), 74-96.

McKenzie, B. A., Wilson, A. E., & Zohdy, S. (2019). *Aedes albopictus* is a competent vector of Zika virus: A meta-analysis. *PloS one*, 14(5), e0216794. doi:<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0216794>go.cr/index.php/biblioteca-de-archivos/vigilancia-de-la-salud/analisis-de-situacion-de-salud

Mousson, L., Dauga, C., Garrigues, T., Schaffner, F., Vazeille, M., & Failloux, A. B. (2005). Phylogeography of *Aedes* (*Stegomyia*) *aegypti* (L.) and *Aedes* (*Stegomyia*) *albopictus* (Skuse)(Diptera: Culicidae) based on mitochondrial DNA variations. *Genetics Research*, 86(1), 1-11. <http://doi.org/10.1017/S001667230500762>

Naim, D. M., Kamal, N. Z. M., & Mahboob, S. (2020). Population structure and genetic diversity of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in Penang as revealed by

mitochondrial DNA cytochrome oxidase I. Saudi journal of biological sciences, 27(3), 953-967.

Oliveira, R. L. D., Vazeille, M., Filippis, A. M. B. D., & Failloux, A. B. (2003). Large genetic differentiation and low variation in vector competence for dengue and yellow fever viruses of *Aedes Albopictus* from Brazil, The United States and the Cayman Islands

Plourde, A. R., & Bloch, E. M. (2016). A Literature Review of Zika Virus. *Emerging Infectious Diseases*, 22(7), 1185-1192. <https://doi.org/10.3201/eid2207.151990>

Rodríguez Romero, W. E., Sáenz Renaud, G. F., & Chaves Villalobos, M. A. (1998). Haplotipos de la hemoglobina S: importancia epidemiológica, antropológica y clínica. *Revista Panamericana de Salud Pública*, 3, 1-8.

Rueda, L. M. (2004). Pictorial keys for the identification of mosquitoes (Diptera: Culicidae) associated with dengue virus transmission. Walter Reed Army Inst Of Research Washington Dc Department Of Entomology.

Shaikevich, E., & Talbalaghi, A. (2013). Molecular characterization of the Asian tiger mosquito *Aedes albopictus* (Skuse)(Diptera: Culicidae) in northern Italy. *International Scholarly Research Notices*, 2013. doi: <http://dx.doi.org/10.1155/2013/157426>

Sim, S., & Hibberd, M. L. (2016). Genomic approaches for understanding dengue: insights from the virus, vector, and host. *Genome Biology*, 17(1), 38. doi:10.1186/s13059-016-0907-2.

Usmani-Brown S, Cohnstaedt L, Munstermann LE. (2009). Population Genetics of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) Invading Populations, Using Mitochondrial nicotinamide Adenine Dinucleotide Dehydrogenase Subunit 5 Sequences. *Ann Entomol Soc Am*. 2009 Jan 1;102(1):144-150. doi: 10.1603/008.102.0116.

Yang C, Sunahara T, Hu J, Futami K, Kawada H, Minakawa N (2021) Searching for a sign of exotic *Aedes albopictus* (Culicidae) introduction in major international seaports on Kyushu Island, Japan. *PLoS Negl Trop Dis* 15(10): e0009827. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0009827>

Zheng, B., Yu, J., Xi, Z., & Tang, M. (2018). The annual abundance of dengue and Zika vector *Aedes albopictus* and its stubbornness to suppression. *Ecological Modelling*, 387, 38-48. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ecolmodel.2018.09.004>

Zhong, D., Lo, E., Hu, R., Metzger, M. E., Cummings, R., Bonizzoni, M., Fujioka, K.K., Sorvillo, T. E., Kluh, S., Healy, S. P., Fredregill, C., Kramer, V. L., Chen, X., Yan, G. (2013). Genetic analysis of invasive *Aedes albopictus* populations in Los Angeles County, California and its potential public health impact. *PloS one*, 8(7), e68586.

Discusión general

En la primera parte del trabajo se logró detectar *Ae. albopictus*, *Ae aegypti*, *Culex corniger*, *Culex coronator*, *Culex interrogstor*, *Culex nigripalpus*, *Culex quinquefasciatus* y *Limatus* spp lo que coincide con reportes previos, en los que además se determinó a *Ae. aegypti* como la especie más abundante (Calderón et al., 2009, Marín et al., 2009). Sin embargo, Calderón y colegas (2009) determinaron a *C. quinquefasciatus* como la segunda especie más frecuente y Marín y colegas (2009) a *Limatus durhami*, mientras que en el presente estudio se estableció a *Ae. albopictus* como la segunda especie más frecuente. Tanto *Culex* como *Limatus* son géneros considerados de importancia para la salud pública, ya que son culícidos hematófagos capaces de transmitir el virus del Nilo Occidental, siendo *C. quinquefasciatus* la principal especie de vector transmisor de ese virus (Retana et al., 2017). La vigilancia de culícidos se ha enfocado principalmente sobre los géneros *Aedes*, *Anopheles* y *Culex*, estudiándose su distribución geográfica y la implementación de actividades de control, dejando de lado a *Limatus*, por su menor impacto epidemiológico en la transmisión de arbovirus (Hernández et al., 2018).

Los índices de diversidad son útiles para caracterizar una región, asociar la diversidad a factores socioambientales y planificar el control de vectores (Confalonieri & Costa, 2012). El presente estudio se realizó durante la estación lluviosa de Costa Rica y se determinó la riqueza específica e índices de diversidad, dando como resultado distritos con mayor o menor riqueza en comparación con los otros, así como diferencias en los índices entre cada distrito. Sin embargo, esta riqueza específica e índices pueden verse afectados durante la estación seca; tal como sucedió en una comunidad de San José, donde se vio una diferencia en las especies de culícidos encontrados en la estación seca donde se encontró *Ae. aegypti* y *Culex. quinquefasciatus* en comparación con la estación lluviosa donde se encontró *Ae. aegypti*, *Culex quinquefasciatus*, *Culex restuans*, *Culex coronator* y *Limatus durhamii* (Calderón et al., 2004).

La razón por la que no se pudo detectar la presencia de arbovirus en las larvas *Ae. albopictus* puede deberse, por un lado, a la baja cantidad de larvas recolectadas (701 individuos, que se analizaron en 23 grupos), sumado a una recolección no sistemática

y a que solamente se logró recolectar larvas en solamente una localidad con brote activo de DENV y analizar 3 grupos de 35 larvas, mientras que las demás larvas se recolectaron en localidades con historia de brotes pasados. Así ocurrió en Brasil, en donde analizaron 1816 individuos (674 insectos adultos y 1142 larvas) y no lograron demostrar la presencia de DENV en *Aedes* spp. (Pinheiro, 2005). Tampoco se pudo detectar DENV y CHIKV en 442 larvas de *Ae. albopictus* capturadas sistemáticamente en una misma región de Brasil entre junio 2015 y abril 2016, pero se logró detectar la presencia de ZIKV en una muestra compuesta de 33 larvas, durante un gran brote que se presentó durante el periodo de la investigación (Maniero et al., 2019). Para lograr la detección del ZIKV los investigadores brasileños recolectaron e forma activa y sistemática los artrópodos durante 10 meses en una región, logrando detectar únicamente en un grupo de *Ae albopictus* la presencia de ZICK, mientras que en la presente investigación solamente se recolecto los artrópodos en una localidad en una única fecha.

Se ha establecido que la trasmisión transovárica o vertical efectiva es de un 0.6% a un 2% en experimentos, y de un 0.2% a 0.8% en forma natural, lo cual también reduce la probabilidad de encontrar larvas infectadas con arbovirus en forma natural. Otro posible factor puede ser atribuido al clima. Se ha reportado que la tasa de transmisión transovárica es mayor en climas áridos (Lequime et al., 2016), clima que no se encuentra en Costa Rica. Esto puede deberse a una adaptación de estos arbovirus para persistir en los climas menos favorables.

En la segunda parte del trabajo se logró encontrar tres haplotipos no reportados con anterioridad en Costa Rica, cada haplotipo fue encontrado solamente en un distrito. Dos de estos nuevos haplotipos se encontraron en el sur del país, y habían sido reportados con anterioridad en Asia, Europa y América del Norte (H6 en China y H3 en Japón, China, Italia, Los Angeles y Hawaii), mientras que el tercer nuevo haplotipo (H26) se encontró en el norte del país, y había sido reportado con anterioridad en Singapur. Los dos haplotipos restantes (H37 y H67), ya se habían reportado con anterioridad presentes en el distrito La Virgen en Sarapiquí (Futami et al., 2015). H37 se encontró distribuido en la zona Pacífica y Atlántica del país, mientras que H67 fue el

que más ampliamente se encontró distribuido, sin embargo, solamente en la zona atlántica. Los hallazgos en el presente trabajo concuerdan con Futami y colaboradores (2015) que también encontraron alta diversidad de haplotipos de *Ae. albopictus* en Sarapiquí, 7 haplotipos en total (H17, H37, H67, H68, H69, H70 y H71). En el presente estudio se encontró un haplotipo adicional no reportado en Sarapiquí, el H26, que puede deberse a un cambio en la población a través del tiempo. Como se estableció en estudios realizados en Medellín, Colombia, donde determinaron en tres barrios y dos periodos (enero-abril 2010 y octubre-diciembre 2012) diferentes haplotipos (Cadavid et al., 2015), concluyendo que la composición genética cambió sin un patrón predecible en un periodo no mayor de dos años. Sin embargo, también puede deberse al tipo de estudio, que no fuera sistemático.

En el presente trabajo también se encontró alta diversidad de haplotipos, en concordancia con Futami y colaboradores (2015), aunque no se encontró tan alta diversidad en un solo distrito, debido al diseño del estudio, que solamente contempló investigar una larva por localidad, por limitaciones económicas. Sin embargo, con las limitaciones del estudio se pudo detectar haplotipos no reportados antes en el país y distribuidas en diversas regiones.

Los haplotipos encontrados, presentaron una estrecha relación entre sí, observándose una diferencia moderada entre los haplotipos reportados anteriormente (H67 y H37) y los nuevos haplotipos (H3 y H26) y una diferencia significativa entre los haplotipos reportados anteriormente y el haplotipo 6. Los haplotipos encontrados son comunes con haplotipos reportados en investigaciones de otros países como Singapur, Italia, Estados Unidos y Panamá lo que sugiere, que pueden haber sido introducidos al país (Futami et al., 2015; Zhong et al., 2013).

Se recomienda realizar estudios sistemáticos con múltiples larvas de cada distrito en temporada de sequía y de lluvia, para determinar los haplotipos presentes en las diferentes estaciones, lo que ayudaría a entender la diversidad, la velocidad de propagación y el flujo genético de las poblaciones naturales.

Conclusiones generales

- *Aedes aegypti* resultó ser la especie más abundante recolectada en la presente investigación, seguida de *Ae. albopictus*.
- Guácimo y La Virgen fueron los distritos con mayor riqueza de culícidos, encontrándose un total de seis especies, mientras que en Jacó, La Suiza y Pital únicamente se encontró *Ae. aegypti*.
- Pavones fue el distrito con mayor y Siquirres el distrito con menor equitatividad, diversidad y abundancia de especies.
- Se reporta por primera vez la presencia de larvas de *Ae. albopictus* (n=105) en la localidad de Punta Morales.
- Se reportaron especies de *Culex* y *Limatus* que son culícidos que podrían tener un papel importante en salud humana y animal.
- Los grupos de larvas de *Ae. albopictus* (n=23) resultaron negativos a DENV, CHIKV y ZIKV en qRT-PCR.
- Se encontró un total de cinco haplotipos (H3, H6, H26, H37 y H67) en once distritos de Costa Rica.
- Los haplotipos H3, H6 y H26 se encontraron en un solo distrito cada uno (H3 en San Isidro de El General, H6 en Daniel Flores y H26 en La Virgen) y no habían sido reportados con anterioridad en el país.
- Los restantes dos haplotipos se encontraron en diferentes distritos y habían sido reportados con anterioridad en Sarapiquí, así se encontró H67 en cinco distritos de Costa Rica (Puerto Viejo, El Cairo, Guácimo, Guápiles y Rita) y H37 en tres distritos de Costa Rica (Buenos Aires, Chomes y Tárcoles).
- Todos los haplotipos encontrados presentaron más de un polimorfismo en su secuencia, los polimorfismos en las posiciones 40 y 94 afectan la secuencia de los aminoácidos.

Recomendaciones generales

- Realizar estudios comparativos sobre índices de diversidad en estación lluviosa y seca para determinar diferencias en las poblaciones de mosquitos en ambas estaciones.

- Recolectar en localidades con brotes de dengue, chikungunya o Zika en forma robusta y sistemática larvas de *Ae. albopictus* para demostrar la transmisión vertical de los arbovirus.
- Investigar en forma experimental la transmisión transovárica de los arbovirus en *Ae. albopictus*, para determinar desde cuál estadio larval se pueden detectar estos virus y durante cuantas generaciones se pueden transmitir.
- Realizar estudios sistemáticos de haplotipos de *Ae. albopictus* y con un mayor número de muestras por distrito o localidad y en diferentes estaciones climáticas.
- Investigar si los haplotipos más abundantes son resistentes a insecticidas y si presentan una transmisión transovárica de arbovirus más efectiva.