

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



**Detección de virus dengue, chikungunya y Zika, y variabilidad genética de larvas
Aedes aegypti en Costa Rica**

Sonia Alejandra Flores Núñez

Universidad Nacional, Heredia

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

Detección de virus dengue, chikungunya y Zika, y variabilidad genética de larvas *Aedes aegypti* en Costa Rica

Sonia Alejandra Flores Núñez

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

MIEMBROS DEL TRIBUNAL EXAMINADOR

Dra. Rocío Castillo Cedeño
Representante del Consejo Central de Posgrado

M.Sc. Sandra Estrada König
Coordinadora del posgrado o su representante

Dra. Gaby Dolz Wiedner
Tutor de tesis

Dra. Ana Jiménez Rocha
Miembro del comité asesor

M.Sc. Silvia Argüello Vargas
Miembro del comité asesor

Sonia Alejandra Flores Núñez
Sustentante

RESUMEN GENERAL

Estudiar la diversidad de mosquitos en una región permite monitorear la aparición de especies nuevas, brinda información sobre la composición de una comunidad de insectos, y ayuda a monitorear la estabilidad de un ecosistema. Esto es importante para la conservación del medio ambiente y el control de arbovirus, como los virus dengue (DENV), chikungunya (CHIKV) y Zika (ZIKV), que son transmitidos principalmente por el mosquito *Aedes aegypti* ocasionando un gran impacto a la salud pública. La transmisión horizontal se considera la más importante en periodos de brote, sin embargo, se ha reportado transmisión vertical que mantiene los virus durante periodos desfavorables, por lo que es importante implementar medidas de manejo del mosquito vector esto. Para esto, es indispensable conocer aspectos de la ecología de *Ae. aegypti*, entre ellos los patrones de dispersión y propagación, como factores que facilitan la invasión y adaptación a nuevos entornos. Se cree, que cambios genéticos en el insecto, podrían facilitar la invasión y adaptación a nuevos entornos, por lo que resulta importante estudiar la diversidad genética de estos mosquitos. El objetivo del primer trabajo fue estimar la diversidad de culícidos y detectar la presencia de DENV, CHIKV y ZIKV en larvas *Ae. aegypti*, mientras que el objetivo del segundo trabajo fue determinar la diversidad genética de poblaciones de larvas *Ae. aegypti* en diferentes localidades de Costa Rica. Se recolectaron, durante agosto a noviembre de 2021, larvas en 26 localidades de 19 distritos, que históricamente habían reportados casos de DENV, CHIKV y ZIKV (n=22) o en los que se reportaron brotes durante la recolecta de muestras (n=4). Las larvas se identificaron a nivel de especie (*Aedes* y *Culex*) o género (*Limatus*). Para cumplir con el primer objetivo, se calcularon diversos índices de diversidad (riqueza específica, similitud de Jaccard, Margalef, Shannon-Weaver y Pielou). Las larvas de *Ae. aegypti* se sometieron a análisis molecular para detectar la presencia de DEN, CHIKV y ZIKV. Se encontraron dos especies de larvas de *Aedes* (*Ae. aegypti*, *Ae. albopictus*), cinco de *Culex* (*Culex coronator*, *Culex corniger*, *Culex quinquefasciatus*, *Culex nigripalpus* y *Culex interrogator*) y larvas del género *Limatus*, determinándose a *Ae. aegypti* como la especie predominante en 20 de 26 localidades. El índice de Pielou demostró que el distrito de Pavones fue el que presentó mayor equitatividad de distribución de las especies. Los distritos de La Virgen y Guácimo presentaron mayor riqueza específica y

diversidad de especies, encontrándose seis de las ocho especies identificadas. En los distritos de Jacó, La Suiza y Pital solamente se detectó una especie (*Ae. aegypti*). Del total de 74 grupos de larvas de *Ae. aegypti* analizadas por RT-qPCR, ninguno resultó positivo para DEN, CHIKV y ZIKV. Se recomienda realizar investigaciones sistemáticas para determinar índices de diversidad tanto en estación lluviosa como estación seca, de diferentes localidades, así como seguir recolectando larvas de *Ae. aegypti* en zonas con brotes de arbovirosis para demostrar la transmisión vertical.

Para cumplir con el segundo objetivo, una larva por localidad se sometió a extracción de ADN y análisis molecular (reacción en cadena de polimerasa convencional del gen mitocondrial del citocromo oxidasa I y secuenciación). *Aedes aegypti* se encontró en 20 de las 26 localidades y en los 19 distritos muestreados. En total se determinaron tres haplotipos (H1, H2 y H3). El haplotipo 1 fue el más abundante y el que presentó mayor distribución, encontrándose en 16 localidades, mientras que los haplotipos 2 y 3 se encontraron en una y tres localidades, respectivamente. Los tres haplotipos presentaron 15 sitios polimórficos, tres de los sitios polimórficos afectaron la secuencia de los aminoácidos. El haplotipo 1 y 2 han sido reportados hasta la fecha solo en Centroamérica y Panamá, mientras que el haplotipo 3 había sido encontrado previamente en Siquirres y se ha reportado presente en Canadá, Nueva Caledonia y Alemania. Se recomienda realizar estudios sistemáticos de haplotipos de *Ae. aegypti* con un mayor número de muestras a analizar por distrito o localidad, y en diferentes estaciones climáticas, para determinar el haplotipo más frecuente y establecer si el país muestra alta o baja diversidad genética de *Ae. aegypti*.

AGRADECIMIENTOS

Al padre celestial, Dios, por haberme ayudado a superar las dificultades y darme la oportunidad de seguir adelante para la culminación de esta travesía.

A mi amada y hermosa familia (Roberto, María, Clarissa, Diana y mis bellos sobrinos) por haber creído en mí, estar siempre a mi lado y sobre todo, por su apoyo para que yo pudiera cumplir mis metas.

A mis amigos (Elisa, Brayan y Evelyn) que me acompañaron en las desveladas, su apoyo emocional e incondicional, por darme siempre ánimos, mis hermanas y hermano de otra madre, amistades que puedo decir son mi familia.

A mis profesores por haberme instruido y pasarme sus conocimientos.

A mi tutora Dra. Gaby Dolz, asesoras Dra. Ana Jiménez y M.Sc. Silvia Argüello por brindarme sugerencias, mejoras y estar pendiente de mi tesis.

A Sergio Alfaro por pasar buenos ratos en el Laboratorio de Zoonosis y sus enseñanzas.

A la organización DAAD por darme la oportunidad de brindarme educación y superarme para cumplir metas para ayudar a mi país con nuevos conocimientos.

Al personal del Ministerio de Salud, máster Gabriela Delgado, técnico Manuel Gutiérrez y bachiller Carlos Aguilar, por apoyarme en las giras y pasarme sus conocimientos.

DEDICATORIA

A Dios por haberme iluminado y haber encontrado esta carrera tan maravillosa.

A mi amado padre Roberto y a mi hermosa madre María, a mis queridas hermanas Clarissa y Diana, mi hermoso sobrino Alejandro y mis bellas sobrinas Suri y Samantha por haberme dado todo su apoyo y comprensión, para que yo pudiera salir adelante y encontrar un futuro brillante.

ÍNDICE

Resumen general	IV
Agradecimientos	VI
Dedicatoria	VII
Índice de cuadros	X
Índice de figuras	XI
Introducción general	XIII
Antecedentes	XIII
<i>Aedes aegypti</i>	XIII
Arbovirus	XVIII
Índices ecológicos de diversidad	XXI
Haplotipos	XXII
Referencias bibliográficas	XXIII

ARTÍCULO I	1
Resumen	1
Abstract	3
1. Introducción	3
2. Materiales y métodos	5
2.1. Diseño del estudio y sitios de muestreo	5
2.2. Recolecta de muestra	5
2.3. Análisis morfológico	5
2.4. Índices ecológicos de diversidad	5
2.4.1. Índice similitud de Jaccard	6
2.4.2. Índice de Margalef	6
2.4.3. Índice de Shannon-Weaver	6
2.4.4. Índice de Pielou	7
2.4.5. Riqueza Especifica	7
2.5. Análisis molecular	7

3. Resultados	9
4. Discusión	15
5. Conclusiones	18
6. Recomendaciones	18
7. Referencias bibliográficas	18
ARTÍCULO 2	26
Resumen	26
Abstract	27
1. Introducción	28
2. Materiales y métodos	30
2.1. Diseño del estudio y sitios de muestreo	30
2.2. Recolecta de muestras	30
2.3. Análisis morfológico	31
2.4. Análisis molecular	31
3. Resultados	32
4. Discusión	36
5. Conclusiones	38
6. Recomendaciones	38
7. Referencias bibliográficas	38
Discusión general	44
Conclusiones generales	48
Recomendaciones generales	48

LISTA DE CUADROS

ARTÍCULO 1.

Cuadro 1. Iniciadores y sondas de RT-qPCR en tiempo real para DENV, CHIKV y ZIKV.

Cuadro 2. Identificación y cuantificación de las especies de larvas de *Aedes*, *Culex* como larvas de género *Limatus* en 19 distritos de Costa Rica, agosto-diciembre 2021.

Cuadro 3. Porcentaje de similitud y diferencias en la distribución de las larvas encontradas utilizando índice de similitud de Jaccard en los 19 distritos de Costa Rica, agosto-diciembre 2021.

Cuadro 4. Valores de riqueza específica e índices de Margalef, Shannon-Weber y Pielou en los 19 distritos analizados.

Cuadro 5. Cantidad de larvas *Ae. aegypti* encontradas y número de grupos analizadas mediante RT-qPCR para DENV, ZIKV y CHIKV en 19 distritos de Costa Rica.

ARTÍCULO 2.

Cuadro 1. Coordenadas geográficas de las localidades en que se encontraron larvas *Ae. aegypti* y tipo de haplotipo identificado.

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

Cuadro 3. Sitios polimórficos de los tres haplotipos del gen COI en las secuencias de *Ae. aegypti* encontrados en Costa Rica.

Cuadro 4. Sitios de cambios de aminoácidos de los tres haplotipos (H1, H2 y H3) de larvas *Ae. aegypti* de Costa Rica, encontrados en las secuencias del gen COI.

LISTA DE FIGURAS

INTRODUCCIÓN GENERAL.

Figura 1. Huevo *Aedes aegypti* (Zettel & Kaufman, 2009).

Figura 2. A: Vista dorsal larva *Ae. aegypti* en cuarto estadio, **B:** espinas dorsales en tórax, **C:** hilera de escamas del peine y **D:** escama característica con espina media y dientes laterales en forma de tridente (Farajollahi & Price, 2013).

Figura 3. A: Vista lateral pupa *Ae. aegypti*, **B:** Parte final del abdomen que muestra característica distintiva para diferenciarla de otras especies de pupas (Becker et al., 2010; Funasa, 2001).

Figura 4. A: Anatomía del adulto *Ae. aegypti*, **B:** Diferencia entre macho y hembra, **C:** y **D:** Características para diferenciarlo de otras especies de *Aedes* (Rueda, 2004).

ARTÍCULO 1.

Figura 1. Resultados de los 74 grupos de larvas analizadas por RT-qPCR para detección de DENV, curva negra: control positivo DENV.

Figura 2. Resultados de los 74 grupos de larvas analizadas por RT-qPCR para detección de CHIKV, curva roja: control positivo CHIKV.

Figura 3. Resultados de los 74 grupos de larvas analizadas por RT-qPCR para detección de ZIKV, curva amarilla: control positivo ZIKV.

ARTÍCULO 2.

Figura 1. Mapa de distribución de haplotipos de *Ae. aegypti* encontrados en las diferentes localidades en Costa Rica, agosto a diciembre 2021. Haplotipo 3: reportado previamente en el año 2018 en Siquirres.

Figura 2. Árbol filogenético de los haplotipos de *Ae. aegypti* encontrados en 20 localidades de Costa Rica, agosto a diciembre 2021, basados en la secuencia del gen COI y generado mediante el uso de MEGA 10.1.8.

INTRODUCCIÓN GENERAL

Antecedentes

Los alfavirus y flavivirus son los arbovirus de mayor importancia médica, ocasionando manifestaciones clínicas severas (poliartralgia, fiebre $>38^{\circ}$ C, sangrados) y complicaciones para la salud (microcefalia y síndrome de Güillain-Barré), afectando sobre todo a niños y ancianos, siendo los mosquitos del género *Aedes*, principalmente *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus*, los principales vectores que participan en la transmisión de estos virus (Jones et al., 2020; Marchi et al., 2018; Peña-García et al., 2017).

Aedes aegypti

Taxonomía, distribución y hábitat

El mosquito *Aedes aegypti* pertenece al reino Animalia, filo Arthropoda, clase Insecta, orden Diptera, familia Culicidae y género *Aedes*. Es un mosquito que se encuentra en latitudes 35° Norte - 35° Sur, en regiones tropicales y subtropicales debajo de los 2000 m.s.n.m., con alta precipitación pluvial y con temperaturas de 14°C - 30°C . *Aedes aegypti* se considera un mosquito doméstico, ya que se encuentra en hogares, su desarrollo se da generalmente en recipientes artificiales de agua dulce en las viviendas y su período de actividad es diurna. Para reposar prefieren lugares húmedos y tranquilos alrededor de las viviendas (a no más de 100 metros de distancia) y solamente logran moverse hasta 3 kilómetros (Castillo-Quino et al., 2018; Kweka et al., 2018; Lubinda et al., 2019; de la Mora-Covarrubias et al., 2010; Nelson, 1986; OECD, 2018; Rossi & Almirón, 2004).

Ciclo de vida y morfología

El ciclo de vida de *Ae. aegypti* se divide en cuatro estadios, el cual dura aproximadamente de 8 a 10 días. Este ciclo se divide en dos fases, una acuática (larva y pupa) y una terrestre (huevo, adulto). Los huevos se caracterizan por ser largos, lisos, de forma ovoide y miden aproximadamente 1 mm de largo. Una vez ovipositados son de color blanco pero se vuelven negros como resultado de la melanización (Figura 1). A una temperatura de 23° C tardan aproximadamente de 48 horas a 5 días en desarrollarse por

completo y aproximadamente 15 minutos en eclosionar (Khetarpal & Khanna, 2016; Nelson, 1986; OECD, 2018; Rossi & Almirón, 2004).



Figura 1. Huevo *Aedes aegypti* (Zettel & Kaufman, 2009).

La cantidad de huevos que ponen las hembras va a depender de la cantidad de sangre que hayan ingerido (100-200 huevos), ovipositando hasta 5 veces durante toda su vida en varios sitios, evitando zonas donde se encuentren huevos de sus congéneres. Las hembras depositan sus huevos en las paredes internas de los recipientes con agua y sobre el nivel del agua. Los huevos pueden sobrevivir temperaturas extremas (inviernos muy fríos de 4°C), a esto se le conoce como diapausa (Byttebier et al., 2014; OECD, 2018; Rossi & Almirón, 2004).

Las larvas están conformadas por cabeza, tórax y un abdomen (Figura 2a). El tórax y abdomen es de tejido suave y membranoso mientras que la cabeza presenta placas endurecidas-esclerotizadas. En el segmento posterior de la larva se encuentran cuatro branquias lobuladas que regulan la osmosis y un sifón corto para poder respirar oxígeno (Figura 2a). Las larvas mudan por cuatro estadios, que se diferencian por su tamaño (1mm a 8mm). Las larvas prefieren lugares sombreados (son fotofóbicas), pueden tolerar variaciones del pH y pueden desarrollarse tanto en agua limpia (de preferencia) como agua con abundante materia orgánica en descomposición. El desarrollo de las larvas es totalmente acuático y tarda aproximadamente de 7 a 14 días (5 días en condiciones favorables) contando con movilidad para conseguir sus alimentos. La larva *Ae. aegypti* se diferencia de otras especies de *Aedes* por poseer prominentes espinas laterales en forma de garra en el tórax (Figura 2b) y una hilera recta de 7 a 12 escamas del peine en

el último segmento abdominal. Esas escamas tienen una espina media y dientes laterales (Figura 2C y 2D). En las larvas existe un proceso conocido como de síndrome diapausa larval, que consiste en la prolongación del tercer y cuarto estadio larvario, por la reducción metabólica y locomotora cuando disminuye la temperatura o el fotoperíodo (Nelson, 1986; OECD, 2018; Rossi & Almirón, 2004).

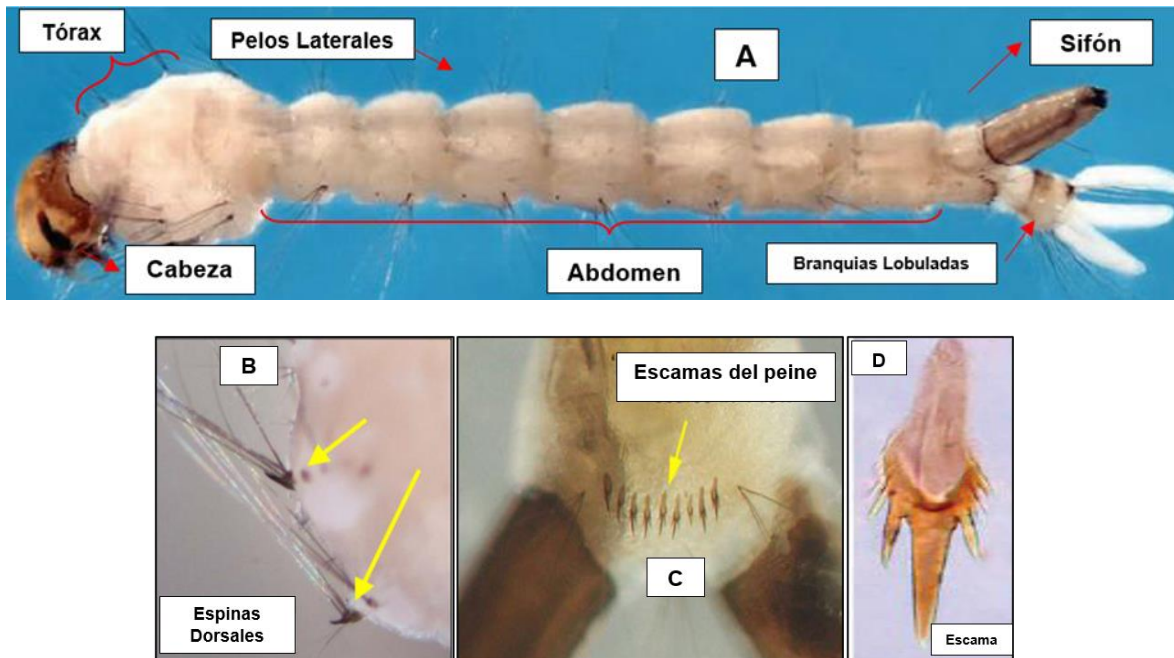


Figura 2. A: Vista dorsal larva *Ae. aegypti* en cuarto estadio, B: espinas dorsales en tórax, C: hilera de escamas del peine y D: escama característica con espina media y dientes laterales en forma de tridente (Farajollahi & Price, 2013).

La pupa es el estadio que precede la etapa adulta. Su cuerpo tiene forma de coma y está conformado por dos secciones principales: cefalotórax (cabeza y tórax fusionados) y abdomen (Figura 3A). Las pupas permanecen inmóviles, no se alimentan, son fotofóbicas y los machos son de menor tamaño. Esta etapa dura aproximadamente 2 días a temperatura de 28°C a 32°C. Para diferenciarlas de otras especies, se utiliza la característica de las paletas natatorias, que solo tiene un pelo sobresaliente y alrededor pequeños cilios (Figura 3B) (Nelson, 1986; OECD, 2018; Rossi & Almirón, 2004).

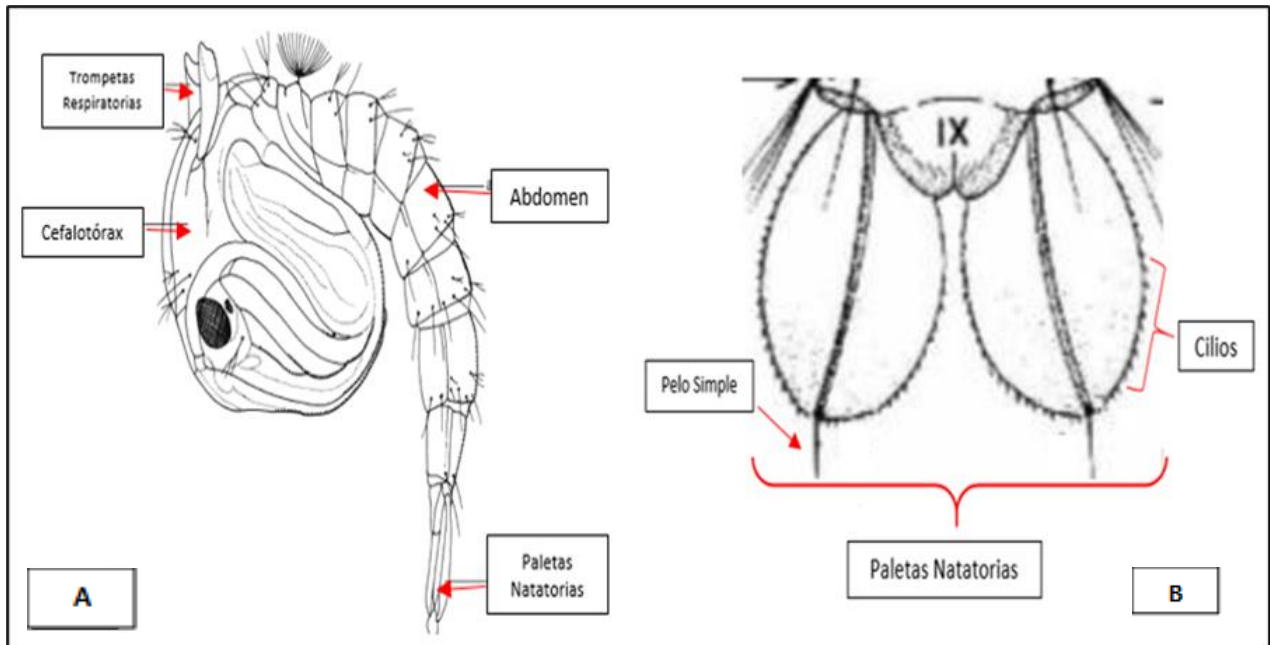
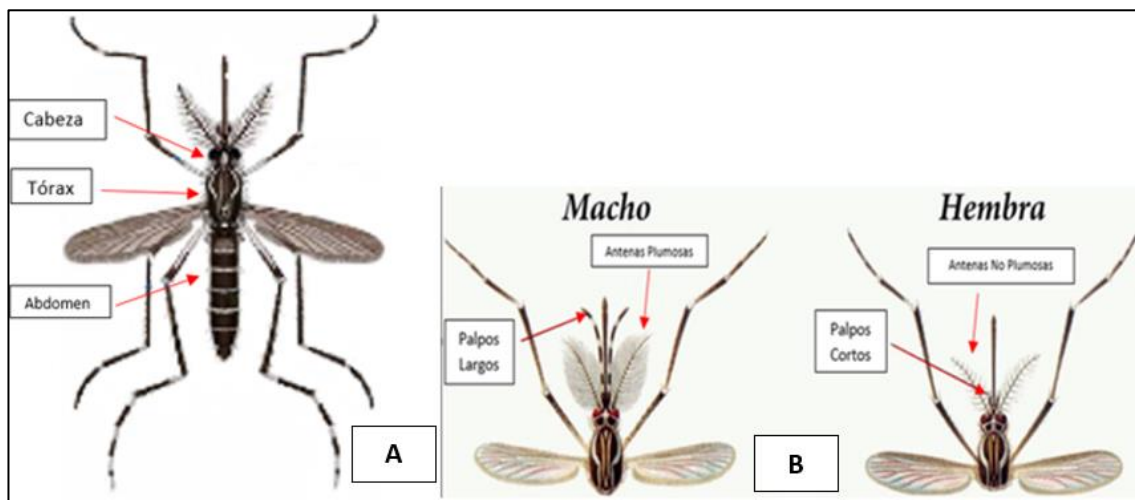


Figura 3. A: Vista lateral pupa *Ae. aegypti*, **B:** Parte final del abdomen que muestra característica distintiva para diferenciarla de otras especies de pupas (Becker et al., 2010; Funasa, 2001).

El adulto está compuesto por cabeza, tórax y abdomen (Figura 4A). Puede vivir de 2 a 4 semanas. Para hacer distinción entre sexos, el macho tiene antenas plumosas y palpos más largos (Figura 4B). El *Ae. aegypti* se diferencia por ser de color negro, en el tórax posee marcas blancas en forma de lira y patas con bandas blancas (Figura 4C y 4D) (Nelson, 1986; OECD, 2018).



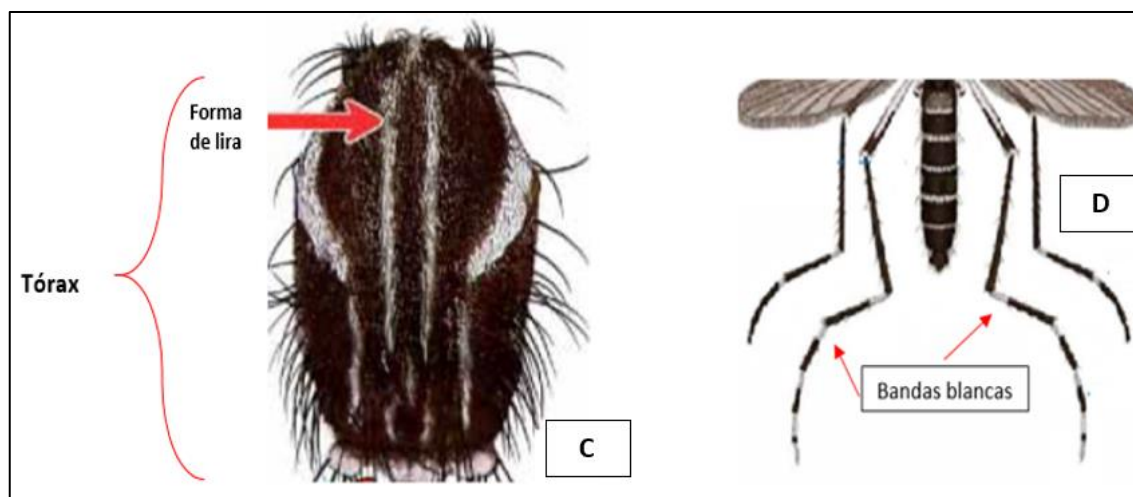


Figura 4. A: Anatomía del adulto *Ae. aegypti*, **B:** Diferencia entre macho y hembra, **C:** y **D:** Características para diferenciarlo de otras especies de *Aedes* (Rueda, 2004).

Transmisión

Ae. aegypti se considera un mosquito de importancia médica por ser vector biológico de varios arbovirus como el virus del dengue (DENV), virus chikungunya (CHIKV) y virus Zika (ZIKV), los cuales transmiten a hospedadores vertebrados susceptibles. En los vectores los arbovirus son pasados vía transestadial o por pasaje transovárico. La hembra *Ae. aegypti* adquiere el virus al ingerir sangre de un huésped virémico. El virus infecta las células epiteliales del intestino medio para luego diseminarse e infectar glándulas salivales, aquí se replica y permanece durante toda la vida. La transmisión transovárica del virus ocurre por infección de los tejidos germinales de las hembras en los mosquitos, también se ha reportado transmisión transhuevo (el virus infecta el huevo durante la oviposición). Los huevos infectados se liberan al medio ambiente y el virus puede persistir en los estadios larvarios, etapa de pupa y en los mosquitos adultos. Las hembras al picar al hospedero, regurgitan saliva y lo infectan (Arredondo-García et al., 2016; Agarwal et al., 2017; Jing & Wang, 2019; Lequime et al., 2016; Reisen, 2008). La transmisión horizontal es la más común y es la responsable de mantener la presencia de los virus en el medio ambiente. El mantenimiento de las arbovirus durante los períodos interepidémicos se debe a la transmisión transovárica y puede durar varias generaciones sucesivas comprobado en laboratorio (Ferreira-de-Lima & Lima-Camara, 2018). Ambos mecanismos de transmisión son vitales para la supervivencia de los virus. La transmisión

transovárica de los arbovirus en períodos de diapausa o de sequía además facilitan la persistencia durante períodos con baja población de mosquitos adultos (Izquierdo-Suzán et al., 2019; Manuel et al., 2020).

Epidemiología y control vectorial

Según la Organización Panamericana de la Salud (OPS), durante las semanas epidemiológicas 1 y 21 del 2020 se notificaron 1,645,678 casos de arbovirosis en América, donde 1,600,947 casos fueron de DENV (97.3%), 37,279 casos de CHIKV y 7,452 casos de ZIKV. Hubo una reducción de un 10% de los casos notificados en el 2020 comparado con el año 2019, además se reportaron casos de los cuatro serotipos de dengue. En Costa Rica, el Ministerio de Salud (MINSAL) reportó en el año 2020 un total de 9,438 casos de DENV, donde el cantón de Pérez Zeledón fue el más afectado con 1,245 casos de DENV y los serotipos circulantes fueron el DENV1 y DENV2; 49 casos de CHIKV donde el cantón más afectado fue Puntarenas con 7 casos, y 121 casos de ZIKV donde el cantón más afectado con 12 casos fue Siquirres (Ministerio de Salud, 2020; OPS, 2020).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) promueve el manejo integral de vectores en los programas de control eso es una combinación de control químico (insecticidas), control biológico (bacterias, peces o copépodos) y control ambiental (eliminación de criaderos o zonas de reproducción) (Tapia-López et al., 2019). El control ambiental es ecológico y trata de disminuir la población vectorial mediante la eliminación de criaderos, pero el control químico sigue siendo la medida más efectiva y utilizada en períodos de epidemia. En Costa Rica, se utilizan insecticidas piretroides (deltametrina y cipermetrina) como adulticidas y organofosforados (temefós) como larvicidas para el control del mosquito *Ae. aegypti* (Calderón-Arguedas et al., 2018).

Arbovirus

Virus del Dengue

El DENV pertenece al reino Riboviria, filo Orthornavirae, familia Flaviviridae y género Flavivirus. Es un virus esférico de 40-50 nm de diámetro, envuelto, de cadena simple de ARN monocatenario de polaridad positiva, el cual codifica para 10 proteínas (3

estructurales y 7 no estructurales). Se conocen cuatro serotipos (DENV-1 al DENV-4), los cuales coinciden en un 65% en sus secuencias de ARN. Existe evidencia que el virus del Dengue se puede transmitir en forma transovárica en *Ae. aegypti*. El DENV2 se ha asociado con mayor frecuencia a casos severos. La coinfección por múltiples serotipos de DENV ha sido reportada en muchos países endémicos como China, Brasil e India. La enfermedad del dengue otorga inmunidad de por vida contra el serotipo que ha ocasionado la infección e inmunidad cruzada con los otros serotipos, que puede durar de 9 a 12 meses (Arredondo-García et al., 2016; Cervantes & Ramos, 2017; Cortés et al., 2007; Cucunawangsih & Lugito, 2017; Ferreira-de-Lima & Lima-Camara, 2018; ICTV, 2020).

La enfermedad del dengue posee un período de incubación de 4 a 7 días, pero puede durar de 3 a 10 días, donde las manifestaciones clínicas son de inicio abrupto e inespecíficas (se puede confundir con un cuadro gripal) y menos del 5% pueden presentar dengue severo. Se caracteriza por fiebre $>39^{\circ}$ C, cefaleas, mialgias, artralgias, hiporexia, astenia, náuseas y erupción cutánea máculo-papular. Sin el tratamiento adecuado, la tasa de mortalidad puede superar el 20%. En el año 1961 Costa Rica se declaró país libre del vector *Ae. aegypti*, sin embargo, 10 años después se estableció nuevamente la presencia de este mosquito en el país. En octubre de 1993, se reportó el primer caso de DENV, después de aproximadamente 30 años de ausencia. El DENV1 fue el serotipo más frecuentemente aislado en la región Pacífico Central (Puntarenas) y región Chorotega (Liberia), luego se extendieron los casos a otras zonas del país. En la actualidad, el distrito de San Isidro de El General es el más afectado con 747 casos para el año 2020 (Ávila, 2004; Ministerio de Salud, 2020; Morice et al., 2010; Schaefer et al., 2020).

Virus de Chikungunya

El CHIKV pertenece al reino Riboviria, filo Orthornavirae, familia Togaviridae y género Alfavirus. Es un virus esférico de 60-70 nm de diámetro, envuelto, de cadena simple de ARN monocatenario de polaridad positiva de 12 kb, el cual codifica para 9 proteínas (5 proteínas estructurales y 4 proteínas no estructurales). El CHIKV se puede transmitir

mediante la picadura del vector o por vía transplacentaria de la madre al feto (provoca abortos en el primer trimestre de embarazo). El mosquito hembra del *Ae. aegypti* adquiere el virus a partir de un huésped virémico, y luego de un periodo promedio de incubación de diez días, transmite el virus a un huésped susceptible. En Brasil se determinó transmisión transovárica del CHIKV en *Ae. aegypti* mediante reacción en cadena de polimerasa en tiempo real (qPCR). Este virus posee un único serotipo que confiere inmunidad de por vida (Arredondo-García et al., 2016; Costa-da-Silva et al., 2017; Frolov & Frolova, 2018; ICTV, 2020). El período de incubación es de 3 a 7 días (promedio de 2 a 12 días). Las manifestaciones clínicas comienzan abruptamente con fiebre >38,9° C seguidamente se desarrollan poliartralgias severas y debilitantes de carácter simétricas afectando articulaciones principalmente de muñecas, codos, dedos, rodillas y tobillos. Después de la fase aguda, algunos pacientes desarrollan síntomas prolongados, que pueden durar de semanas a meses, que incluyen fatiga, dolor articular incapacitante y tenosinovitis o poliartritis edematosa de los dedos. CHIKV se aisló por primera vez durante una epidemia en Tanzania entre 1952-1953. En diciembre del 2013, el virus de chikungunya llegó al continente Americano, reportándose casos en la isla caribeña de Saint Martin. En julio del 2014 se reportaron los primeros casos autóctonos en Venezuela, los Estados Unidos de América, Panamá y Costa Rica. En la actualidad, el distrito de Chacarita es el más afectado, reportándose tres casos para el año 2020 (Corrales-Aguilar et al., 2015; Ministerio de Salud, 2020; Staples et al., 2009).

Virus del Zika

El ZIKV pertenece al reino Riboviria, filo Orthornavirae, familia Flaviviridae y género Flavivirus. Es un virus esférico de 50 nm de diámetro, envuelto, de cadena simple ARN monocatenario positivo de aproximadamente 10.8 kb, el cual codifica para 10 proteínas (3 proteínas estructurales y 7 proteínas no estructurales). El ZIKV utiliza diferentes estrategias para su transmisión: entre las personas por contacto sexual, transmisión perinatal o intraparto, por transfusión de hemoderivados y trasplante de órganos infectados o por picadura del vector. Se ha demostrado además, que el virus se transmite en *Ae. aegypti* por vía transovárica (Otero & Padrón, 2018; Sirohi & Kuhn, 2017; Zhu et al., 2020). El período de incubación es de 3-12 días pero el 80% de los pacientes

infectados son asintomáticos. Las manifestaciones clínicas son fiebre leve, cefalea, artralgia, erupción cutánea, conjuntivitis y alteraciones gastrointestinales. La evolución de la enfermedad es de carácter leve y autolimitada; los pacientes se recuperan en una semana pero se ha visto relacionada con complicaciones neuropáticas graves. En los neonatos se ha evidenciado el desarrollo congénito de microcefalia, neuropatía óptica y glaucoma mientras que en adultos se desarrolla una parálisis ascendente bilateral simétrica conocido como Síndrome de Guillain Barré. Este virus se identificó por primera vez en 1947 en monos “Rhesus” que habitaban el bosque de Zika en Uganda. En el 2015, este virus se introdujo en el continente americano, siendo Brasil quien reportó la circulación e infección autóctona del ZIKV, además confirmando trastornos neurológicos e incremento inusual de microcefalia secundaria en recién nacidos por la infección del virus en el periodo de gestación. En Costa Rica, se reportó el primer caso importado el 26 de enero del 2016, en un paciente masculino que había viajado a Colombia y el primer caso autóctono en la semana epidemiológica 4 del mismo año en una mujer embarazada residente de Guanacaste. Actualmente, los distritos Siquirres y Cariari (Limón), Espíritu Santo (Puntarenas) y, Orotina, San Rafael y San José (Alajuela) son los más afectados con cuatro casos (Corrales-Aguilar & Soto, 2016; Ministerio de Salud, 2020; Sharma et al., 2020).

Índices ecológicos de diversidad

Existen aproximadamente 3,500 especies de mosquitos en el mundo, el 31% de éstos se encuentra en regiones neotropicales, y solo un 10% se consideran vectores transmisores de arbovirus (Attaullah et al., 2021). Costa Rica posee una gran diversidad de mosquitos, en total 154 especies (Foley et al., 2007). Estudiar la diversidad de mosquitos en una región permite monitorear el riesgo asociado a la aparición y propagación de especies nuevas invasoras (especies exóticas), que pueden transmitir agentes infecciosos; o establecer y monitorear los mosquitos presentes en una región específica (especies endémicas), aportando información para la vigilancia epidemiológica y la conservación del medio ambiente (Morris et al., 2014).

Haplotipos

La transmisión de los arbovirus depende de factores endógenos, que conforman el sistema virus-vector, como la fisiología, biología, genética del virus y genética del vector, y de factores externos como el clima y geográfica, que pueden favorecer la variabilidad genética de poblaciones del género *Aedes* (Quintanilla, 2022). A nivel mundial se ha identificado variantes genéticas de *Ae. aegypti*, que han ayudado a establecer patrones de dispersión y estudios de dinámica poblacional. Para determinar la variabilidad genética de poblaciones de mosquitos *Aedes* se utilizan pruebas moleculares que amplifican el gen citocromo oxidasa I (COI). Con este gen es posible identificar las especies de mosquitos (Atencia et al., 2018; Cevallos et al., 2019; Mousson et al., 2005). Conocer la dinámica poblacional del mosquito *Ae. aegypti* puede ayudar a un país endémico a desarrollar estrategias y medidas de prevención eficaces para su control, además brinda información relevante sobre la historia evolutiva de las poblaciones, su adaptación y dispersión en el medio ambiente, desarrollo de cepas resistentes a insecticidas, y cambios en el comportamiento ecológico y epidemiología de las enfermedades (Caldera et al., 2013).

Un estudio realizado en Tailandia demostró que las poblaciones de mosquitos analizadas en áreas urbanas fueron panmícticas mientras que las de las áreas rurales se encontraban más diferenciadas concluyendo a que se debía posiblemente a la disponibilidad de múltiples criaderos para la oviposición de la hembra, favoreciendo su dispersión en ese hábitat. Un estudio en Camboya determinó una reducción de la diversidad genética en poblaciones de mosquitos inducidos por factores naturales (disponibilidad de hábitats) y factores humanos (uso de insecticidas) (Urdaneta-Marquez & Failloux, 2011). En Senegal un estudio demostró que poblaciones domésticas de *Ae. aegypti* tienden a tener menor diversidad y diferenciación genética en comparación con poblaciones selváticas (Huber et al., 2008). Estudios en Sudamérica han determinado alta variabilidad genética de *Ae. aegypti*, que podría ocasionar cambios en el comportamiento de picadura, nivel de antropofilia, capacidad y competencia vectorial, resistencia a insecticidas y otros aspectos relevantes en la transmisión de patógenos (Valencia, 2018). En Brasil se establecieron niveles reducidos en el flujo de genes entre

las poblaciones de *Ae. aegypti* y marcadas diferencias genéticas entre las poblaciones lo cual relacionaron con la reducción de las poblaciones debido al uso excesivo de insecticidas durante las campañas de control vectorial (Sousa et al., 2017). Los únicos estudios que existen en Costa Rica sobre diversidad genética de *Ae. aegypti* se realizaron con especímenes, de Siquirres, determinando similitudes con especímenes de América del Norte y del Sur (Gloria-Soria et al., 2016). Además, identificaron en Siquirres un haplotipo A, que también fue detectado en EUA y México, mientras que el haplotipo G no coincidió con secuencias de otros países. Estos estudios contribuyeron a conocer el origen del *Ae. aegypti*, entendiendo el medio de transporte que utilizó para ingresar al país, evaluar las implicaciones para la salud pública y guiar esfuerzos para su control (Gloria-Soria et al., 2018).

Referencias bibliográficas

Agarwal, A., Parida, M., & Dash, P. K. (2017). Impact of transmission cycles and vector competence on global expansion and emergence of arboviruses. *Reviews in medical virology*, 27(5), e1941. <https://doi.org/10.1002/rmv.1941>

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

Atencia, M. C., Pérez, M. D. J., Caldera, S. M., Jaramillo, M. C., & Bejarano, E. E. (2018). Variabilidad genética de *Aedes aegypti* en el departamento de Sucre, Colombia, mediante el análisis de la secuencia de nucleótidos del gen mitocondrial ND4. *Biomédica*, 38(2), 267-276. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v38i0.3728>

Attallah, M., Gul, S., Bibi, D., Andaleeb, A., Ilahi, I., Siraj, M., Ahmada, M., Ullaha, I., Alia, M., AhmadaUllah, S., Z. (2021). Diversity, distribution and relative abundance of the mosquito fauna (Diptera: Culicidae) of Malakand and Dir Lower, Pakistan. *Brazilian Journal of Biology*, 83. <https://doi.org/10.1590/1519-6984.247374>

Ávila Agüero, M. L. (2004). Dengue: Una enfermedad que vino para quedarse. *Revista Médica del Hospital Nacional de Niños Dr. Carlos Sáenz Herrera*, 39(1), 34-41. https://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1017-85462004000100004

Becker, N., Petrić, D., Zgomba, M., Boase, C., Madon, M., Dahl, C., Kaiser, A. (2010) Morphology of Mosquitoes. In: *Mosquitoes and Their Control*. Springer, Berlin, Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-540-92874-4_5

Byttebier, B., De Majo, M. S., & Fischer, S. (2014). Hatching response of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) eggs at low temperatures: Effects of hatching media and storage conditions. *Journal of medical entomology*, 51(1), 97-103. <https://doi.org/10.1603/ME13066>

Caldera, S. M., Jaramillo, M. C., Cochero, S., Pérez-Doria, A., & Bejarano, E. E. (2013). Diferencias genéticas entre poblaciones de *Aedes aegypti* de municipios del norte de Colombia, con baja y alta incidencia de dengue. *Biomédica*, 33, 89-98. <http://doi.org/10.7705/biomedica.v33i0.1573>

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(3), 1-9. <http://www.revmedtropical.sld.cu/index.php/medtropical/article/view/266/208>

Castillo-Quino, R., Vallejo-Castro, E., Camacho-Aliaga, A. V., Quiñones-López, A., & Canelas-Urey, H. I. (2018). Adaptación del mosquito *Aedes aegypti* a 2 550 m snm Cochabamba, Bolivia. Febrero 2016. *Gaceta Médica Boliviana*, 41(1), 24-30. http://www.scielo.org.bo/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1012-29662018000100006

Cervantes, P., & Ramos, J. (2017). La respuesta inmunológica contra el virus del dengue y la vacunación. *Revista Latinoamericana de Infectología Pediátrica*, 30(3), 102-106. <https://www.medigraphic.com/pdfs/infectologia/lip-2017/lip173d.pdf>

Cevallos, V., Benítez, D., Coloma, J., Carrazco, A., Wang, C., Holecheck, S., Quiroga, C., Castillo, G., Tillis, B., Ponce, P. (2019). Genetic variation of *Aedes aegypti* populations from Ecuador. bioRxiv. <https://doi.org/10.1101/2019.12.17.875591>

Corrales-Aguilar, E., Troyo, A., & Calderón-Arguedas, Ó. (2015). Chikungunya: un virus que nos acecha. *Acta Médica Costarricense*, 57(1), 07-15. <https://www.scielo.sa.cr/pdf/amc/v57n1/art02v57n1.pdf>

Cortés, F. M., Gómez, S. Y., & Ocazonez, R. E. (2007). Subtipos de virus dengue serotipos 2, 3 y 4 aislados en el Departamento de Santander, Colombia. *Revista Cubana de Medicina Tropical*, 59(3), 0-0. http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0375-07602007000300002

Costa-da-Silva, A. L., Ioshino, R. S., Petersen, V., Lima, A. F., Cunha, M. D. P., Wiley, M. R., Ladner, J.T., Prieto, K., Palacios, G., Duarte, D., Suesdek, L., de Andrade, P., Capurro, M. L. (2017). First report of naturally infected *Aedes aegypti* with chikungunya virus genotype ECSA in the Americas. *PLoS neglected tropical diseases*, 11(6), e0005630. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005630>

Cucunawangsih, & Lugito, N. P. H. (2017). Trends of dengue disease epidemiology. *Virology: research and treatment*, 8, 1178122X17695836. <https://doi.org/10.1177/1178122X17695836>

de la Mora-Covarrubias, A., Jiménez-Vega, F., & Maritza Treviño-Aguilar, S. (2010). Distribución geoespacial y detección del virus del dengue en mosquitos *Aedes* (*Stegomyia*) *aegypti* de Ciudad Juárez, Chihuahua, México. *Salud pública de México*, 52(2), 127-133. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0036-36342010000200004

Farajollahi, A., & Price, D. C. (2013). A rapid identification guide for larvae of the most common North American container-inhabiting *Aedes* species of medical importance.

Journal of the American Mosquito Control Association, 29(3), 203-221.
<http://doi.org/10.2987/11-6198R.1>

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), 1-8.
<https://parasitesandvectors.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13071-018-2643-9>

Foley, D. H., Rueda, L. M., & Wilkerson, R. C. (2007). Insight into global mosquito biogeography from country species records. *Journal of Medical Entomology*, 44(4), 554-567. [https://doi.org/10.1603/0022-2585\(2007\)44\[554:iigmbf\]2.0.co;2](https://doi.org/10.1603/0022-2585(2007)44[554:iigmbf]2.0.co;2)

Frolov, I., & Frolova, E. I. (2018). Molecular virology of Chikungunya virus. http://doi.org/10.1007/82_2018_146

Funasa. (2001). Dengue: Instruções para pessoal de combate ao vetor. https://bvsmis.saude.gov.br/bvs/publicacoes/funasa/man_dengue.pdf

Gloria-Soria, A., Ayala, D., Bheecarry, A., Calderon-Arguedas, O., Chadee, D. D., Chiappero, M., Coetzee, M., Elahee, K. B., Fernandez-Salas, I., Kamal, H. A., Kamgang, B., Khater, E. I., Kramer, L. D., Kramer, V., Lopez-Solis, A., Lutomiah, J., Martins, A., Jr, Micieli, M. V., Paupy, C., Ponlawat, A., Rahola, N., Rasheed, S., Richardson, J., Saleh, A., Sanchez-Casas, R., Seixas, G., Sousa, C., Tabachnick, N., Troyo, A., Powell, J. R. (2016). Global genetic diversity of *Aedes aegypti*. *Molecular ecology*, 25(21), 5377–5395.
<https://doi.org/10.1111/mec.13866>

Gloria-Soria, A., Lima, A., Lovin, D. D., Cunningham, J. M., Severson, D. W., & Powell, J. R. (2018). Origin of a high-latitude population of *Aedes aegypti* in Washington, DC. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 98(2), 445.
<https://doi.org/10.4269/ajtmh.17-0676>

Huber, K., Ba, Y., Dia, I., Mathiot, C., Sall, A. A., & Diallo, M. (2008). *Aedes aegypti* in Senegal: genetic diversity and genetic structure of domestic and sylvatic populations. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 79(2), 218-229. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2008.79.218>

ICTV. (2020). Chikungunya virus. https://talk.ictvonline.org/taxonomy/p/taxonomy-history?taxnode_id=19710125&src=NCBI&ictv_id=19710125

ICTV. (2020). Dengue virus. https://talk.ictvonline.org/taxonomy/p/taxonomy-history?taxnode_id=19710125&src=NCBI&ictv_id=19710125

ICTV. (2020). Zika virus. https://talk.ictvonline.org/taxonomy/p/taxonomy-history?taxnode_id=19710125&src=NCBI&ictv_id=19710125

Izquierdo-Suzán, M., Zárate, S., Torres-Flores, J., Correa-Morales, F., González-Acosta, C., Sevilla-Reyes, E. E., Lira, R., Alcaraz-Estrada, S.L., Yocupicio-Monroy, M. (2019). Natural vertical transmission of Zika virus in larval *Aedes aegypti* populations, Morelos, Mexico. *Emerging infectious diseases*, 25(8), 1477. <https://doi.org/10.3201/eid2508.181533>

Jing, Q., & Wang, M. (2019). Dengue epidemiology. *Global Health Journal*, 3(2), 37-45. <https://doi.org/10.1016/j.glohj.2019.06.002>

Jones, R., Kulkarni, M. A., Davidson, T. M., RADAM-LAC Research Team, & Talbot, B. (2020). Arbovirus vectors of epidemiological concern in the Americas: a scoping review of entomological studies on Zika, dengue and chikungunya virus vectors. *PloS one*, 15(2), e0220753. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0220753>

Khetarpal, N., & Khanna, I. (2016). Dengue fever: causes, complications, and vaccine strategies. *Journal of immunology research*, 2016. <http://doi.org/10.1155/2016/6803098>

Kweka, E. J., Baraka, V., Mathias, L., Mwang'onde, B., Baraka, G., Lyaruu, L., & Mahande, A. M. (2018). Ecology of Aedes mosquitoes, the major vectors of Arboviruses in human population. Dengue Fever-A resilient threat in the face of innovation, 39-56. <http://doi.org/10.5772/intechopen.81439>

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

Lubinda, J., Walsh, M. R., Moore, A. J., Hanafi-Bojd, A. A., Akgun, S., Zhao, B., Barro, A., Begum, M., Jamal, H., Angulo-Molina, A., Haque, U. (2019). Environmental suitability for Aedes aegypti and Aedes albopictus and the spatial distribution of major arboviral infections in Mexico. Parasite epidemiology and control, 6, e00116. <https://doi.org/10.1016/j.parepi.2019.e00116>

Manuel, M., Missé, D., & Pompon, J. (2020). Highly Efficient Vertical Transmission for Zika Virus in Aedes aegypti after Long Extrinsic Incubation Time. Pathogens, 9(5), 366. <http://doi.org/10.3390/pathogens9050366>

Marchi, S., Trombetta, C. M., & Montomoli, E. (2018). Emerging and re-emerging arboviral diseases as a global health problem. Public Health; Majumder, MAA, Ed.; IntechOpen: London, UK, 25-46. <http://doi.org/10.5772/intechopen.77382>

Ministerio de Salud. (2020). Casos de dengue se triplican respecto al año pasado. <https://www.ministeriodesalud.go.cr/index.php/centro-de-prensa/noticias/741-noticias-2020/1747-casos-de-dengue-se-triplican-respecto-al-ano-pasado>

Ministerio de Salud. (2020). Análisis de situación de salud. <https://www.ministeriodesalud.go.cr/index.php/vigilancia-de-la-salud/analisis-de-situacion-de-salud>

Morice, A., Marín, R., & Avila, M. (2010). El dengue en Costa Rica: evolución histórica, situación actual y desafíos. *La Salud Pública en Costa Rica. Estado actual, retos y perspectivas*. San José, 197-217. <https://www.binasss.sa.cr/opac-ms/media/digitales/El%20dengue%20en%20Costa%20Rica.%20Evoluci%C3%B3n%20hist%C3%B3rica,%20situaci%C3%B3n%20actual%20y%20desaf%C3%ADos.pdf>

Morris, E. K., Caruso, T., Buscot, F., Fischer, M., Hancock, C., Maier, T. S., Meiners, T., Müller, C., Obermaier, E., Prati, D., Socher, S.A., Sonnemann, I., Wäschke, 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>

Nelson, M. J. (1986). *Aedes aegypti: Biology and ecology*. https://iris.paho.org/bitstream/handle/10665.2/28514/PNSP8664_eng.pdf?sequence=1&isAllowed=y

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. <http://doi.org/10.1787/9789264302235-en>

OPS. (2020). *Actualización Epidemiológica Dengue y otras Arbovirosis*. https://iris.paho.org/bitstream/handle/10665.2/52289/EpiUpdate10June20202_spa.pdf?sequence=2&isAllowed=y

Otero, D. L., & Padrón, L. S. (2018). Virus Zika: una alerta para la prevención. *Revista de Ciencias Médicas de Pinar del Río*, 22(3), 623-645. http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1561-31942018000300023

Peña-García, V. H., McCracken, M. K., & Christofferson, R. C. (2017). Examining the potential for South American arboviruses to spread beyond the New World. *Current clinical microbiology reports*, 4(4), 208-217. <http://doi.org/10.1007/s40588-017-0076-4>

Quintanilla, J. (2022). Estudio de la variabilidad genética en la secuencia del gen mitocondrial citocromo-oxidasa 1 en poblaciones de *Aedes aegypti* de El Salvador. [Tesis de licenciatura, Universidad de El Salvador]. Sistema bibliotecario-Universidad de El Salvador. <https://ri.ues.edu.sv/id/eprint/29487/>

Reisen, W. K. (2008). Vector Transmission of Animal Viruses. *Desk Encyclopedia of*, 231. <http://doi.org/10.1016/B978-012374410-4.00632-4>

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. Buenos Aires: Fundación Mundo Sano. <https://www.mundosano.org/download/bibliografia/Monografia%205.pdf>

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*. <http://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000527>

Schaefer, T. J., Panda, P. K., & Wolford, R. W. (2020). Dengue Fever. In *StatPearls*. StatPearls Publishing. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28613483/>

Sharma, V., Sharma, M., Dhull, D., Sharma, Y., Kaushik, S., & Kaushik, S. (2020). Zika virus: an emerging challenge to public health worldwide. *Canadian journal of microbiology*, 66(2), 87-98. <https://doi.org/10.1139/cjm-2019-0331>

Sirohi, D., & Kuhn, R. J. (2017). Zika virus structure, maturation, and receptors. *The Journal of infectious diseases*, 216, S935-S944. <http://doi.org/10.1093/infdis/jix515>

Sousa, A. A. D., Fraga, E., Sampaio, I., Schneider, H., & Barros, M. C. (2017). Genetic differentiation in populations of *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae) dengue vector from the Brazilian state of Maranhão. *Revista Brasileira de Entomologia*, 61, 51-59. <https://doi.org/10.1016/j.rbe.2016.10.003>

Staples, J. E., Breiman, R. F., & Powers, A. M. (2009). Chikungunya fever: an epidemiological review of a re-emerging infectious disease. *Clinical infectious diseases*, 49(6), 942-948. <https://doi.org/10.1086/605496>

Tapia-López, E., Bardach, A., Ciapponi, A., Alcaraz, A., García-Perdomo, H. A., Ruvinsky, S., & Belizán, M. (2019). Experiencias, barreras y facilitadores en la implementación de intervenciones de control del *Aedes aegypti* en América Latina y Caribe: estudio cualitativo. *Cadernos de Saúde Pública*, 35, e00092618. <https://doi.org/10.1590/0102-311X00092618>

Urdaneta-Marquez, L., & Failloux, A. B. (2011). Population genetic structure of *Aedes aegypti*, the principal vector of dengue viruses. *Infection, Genetics and Evolution*, 11(2), 253-261. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2010.11.020>

Valencia, M. D. (2018). Análisis de heteromorfismos genéticos de *Aedes aegypti* en dos zonas endémicas de dengue en Colombia. <https://ciencia.lasalle.edu.co/biologia/44/>

Wang, G. (2022). *Aedes aegypti* mtDNA COX1 [Manuscrito no publicado]. Institute for Microbial Epidemiology, Academy of Military Medical Sciences. [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/OM865376.1?report=genbank&log\\$=nuclalign&blast_rank=15&RID=96ZCNT5P016](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/OM865376.1?report=genbank&log$=nuclalign&blast_rank=15&RID=96ZCNT5P016)

Zhu, C., Jiang, Y., Zhang, Q., Gao, J., Gu, Z., Lan, C., Li, C., Li, C., Dong, Y., Xing, D., Li, J., Guo, X., Zhao, T. (2020). Vertical Transmission of Zika Virus by Jiegao and Mengding

Aedes aegypti (Diptera: Culicidae) Strains in Yunnan Province in China. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 20(9), 664-669. <http://doi.org/10.1089/vbz.2019.2581>

Artículo 1

Diversidad de culícidos y presencia de los virus dengue, chikungunya y Zika en larvas *Aedes aegypti* en Costa Rica

Resumen

Estudiar la diversidad de mosquitos en una región permite monitorear la aparición de especies nuevas, brinda información sobre la composición de una comunidad de insectos y ayuda a monitorear la estabilidad de un ecosistema. Esto es importante para la conservación del medio ambiente y el control de arbovirus, como los virus del dengue (DENV), chikungunya (CHIKV) y Zika (ZIKV), que son transmitidos principalmente por el mosquito *Aedes aegypti* ocasionando un gran impacto a la salud pública. La transmisión horizontal se considera la más importante en periodos de brote, sin embargo, se ha reportado transmisión vertical que mantiene los virus durante periodos desfavorables. El objetivo del presente trabajo fue estimar la diversidad de culícidos y detectar la presencia de DENV, CHIKV y ZIKV en larvas *Ae. aegypti*. Durante agosto a noviembre del 2021 se recolectaron larvas de mosquitos en 26 localidades de 19 distritos, que históricamente habían reportados casos de DENV, CHIKV y ZIKV (n=16) o en los que se reportaron brotes durante la recolecta de muestras (n=3). Las larvas se identificaron a nivel de especie (*Aedes* y *Culex*) o género (*Limatus*) y se calcularon diversos índices de diversidad (riqueza específica, similitud de Jaccard, Margalef, Shannon-Weaver y Pielou). Las larvas de *Ae. aegypti* se sometieron a análisis molecular para detectar la presencia de DENV, CHIKV y ZIKV. Se encontraron dos especies de larvas de *Aedes* (*Ae. aegypti*, *Ae. albopictus*), cinco de *Culex* (*Culex coronator*, *Culex corniger*, *Culex quinquefasciatus*, *Culex nigripalpus* y *Culex interrogator*) y larvas del género *Limatus*, determinándose a *Ae. aegypti* como la especie predominante en 20 de 26 localidades. El índice de Pielou demostró que el distrito de Pavones fue el que presentó mayor equitatividad de distribución de las especies. Los distritos de La Virgen y Guácimo presentaron mayor riqueza específica y diversidad de especies, encontrándose en seis de las ocho especies identificadas. En los distritos de Jacó, La Suiza y Pital solamente se detectó una especie (*Ae. aegypti*). Del total de 74 grupos de larvas de *Ae. aegypti* analizadas mediante técnicas moleculares, ninguno resultó positivo para DENV, CHIKV

y ZIKV. Se recomienda realizar investigaciones sistemáticas para determinar índices de diversidad tanto en estación lluviosa como estación seca, de diferentes localidades, así como seguir recolectando larvas de *Ae. aegypti* en zonas con brotes de arbovirosis para demostrar la transmisión vertical.

Palabras clave

Arbovirus, PCR en tiempo real, índices ecológicos, diversidad, riqueza específica.

Abstract

Studying the diversity of mosquitoes in a region allows monitoring the appearance of new species, provides information on the composition of an insect community, and helps to monitor the stability of an ecosystem. This is important for the conservation of the environment and the control of arboviruses, such as dengue (DENV), chikungunya (CHIKV) and Zika (ZIKV) viruses, which are transmitted mainly by the *Aedes aegypti* mosquito, causing a great impact on health public. Horizontal transmission is considered the most important form of transmission in outbreak periods, however, vertical transmission seems to maintain the virus during unfavorable periods. This study aimed to estimate the diversity of culicids and detect the presence of DENV, CHIKV and ZIKV in *Ae. Aegypti* larvae. During August to November 2021, mosquito larvae were collected in 26 locations in 19 districts, which had historically reported cases of DENV, CHIKV and ZIKV (n=23) or where outbreaks were reported during sample collection (n=3). Larvae were identified at species (*Aedes* and *Culex*) or genus (*Limatus*) level, and various diversity index (specific richness, Jaccard similarity, Margalef, Shannon-Weaver, and Pielou) were calculated. The larvae of *Ae. aegypti* were analyzed using molecular techniques to detect the presence of DENV, CHIKV and ZIKV. Two species of *Aedes* larvae (*Ae. aegypti*, *Ae. albopictus*), five of *Culex* (*Culex coronator*, *Culex corniger*, *Culex quinquefasciatus*, *Culex nigripalpus* and *Culex interrogator*) and larvae of the genus *Limatus* were found, determining *Ae. aegypti* as the predominant species in 20 of the 26 locations. The Pielou index showed that the Pavones district was the one that presented the major equitability of distribution of the species. The districts of La Virgen and Guácimo presented major specific richness and diversity of species, finding six of the eight

identified species. In the districts of Jacó, La Suiza and Pital, only one species (*Ae. aegypti*) was detected. Of the total of 74 groups of larvae of *Ae. aegypti* analyzed by molecular techniques, none were positive for DENV, CHIKV and ZIKV. It is recommended to perform systematic investigations to determine diversity index, both, in the rainy season and dry season, from different localities, as well as to continue collecting *Ae. aegypti* in areas with arboviral outbreaks to demonstrate vertical transmission.

Keywords

Arboviruses, real time PCR, ecological index, diversity, specific richness.

1. Introducción

Costa Rica posee una gran diversidad de mosquitos, en total 154 especies (Foley et al., 2007). Estudiar la diversidad de mosquitos en una región es importante para monitorear la aparición de especies nuevas (especies exóticas) y para establecer las presentes en una región específica (especies endémicas) (Nikookar et al., 2015), aportando información para la vigilancia epidemiológica y a la conservación del medio ambiente (Morris et al., 2014). Los virus dengue (DENV), chikungunya (CHIKV) y Zika (ZIKV) son arbovirus transmitidos principalmente por el mosquito *Aedes aegypti*, mediante la picadura e ingestión de sangre de un huésped virémico. Esta transmisión horizontal se considera como la más importante para el mantenimiento de los arbovirus en la naturaleza, en especial en periodos de brote (Chouin-Carneiro & dos Santos, 2017; Izquierdo-Suzán et al., 2019).

También se ha reportado transmisión vertical (transestadial o transovárica), y es la que mantiene el virus durante los periodos desfavorables. En este mecanismo los arbovirus infectan los tejidos germinales de los mosquitos y el virus persiste en los huevos, en estadios larvarios, pupa y adultos, existiendo el riesgo de posibles brotes durante periodos con baja población de mosquitos adultos (Agarwal et al., 2017; Izquierdo-Suzán et al., 2019). En Tailandia se recolectaron y criaron larvas de *Ae. aegypti* hasta la etapa adulta, encontrando mediante técnicas moleculares los cuatro serotipos de DENV en 119 de 283 grupos de larvas analizadas (Thongrungrat et al., 2011), mientras que en Brasil

se determinó la presencia de DENV en 70 de 146 grupos de larvas *Ae. aegypti* analizadas mediante PCR en tiempo real (da-Costa et al., 2017). Los investigadores concluyeron, que la transmisión transovárica era elevada en áreas endémicas de DENV, contribuyendo al mantenimiento de las arbovirosis y a un aumento de casos debido al desarrollo de mosquitos naturalmente infectados, y que la detección de DENV en formas inmaduras de *Ae. aegypti* era fundamental para anticipar posibles áreas de brote (da-Costa et al., 2017; Ferreira-de-Lima & Lima-Camara, 2018). En un estudio en Brasil, colectaron fases inmaduras (larvas y pupas) para análisis molecular de ZIKV y obtuvieron dos positivos de 18 grupos analizados (Maniero et al., 2019). En otro estudio en Brasil utilizaron larvas para análisis mediante PCR tiempo real y detectaron infección positiva para CHIKV en 5 grupos, para ZIKV en 6 grupos, para DENV 4 grupos, 1 grupo mixto positivo para CHIKV-DENV de 30 grupos analizados, concluyendo que hembras infectadas pueden transmitir de manera transovárica varias arbovirosis simultáneamente, dando como resultado crías coinfectadas y con ello preservando la circulación de arbovirus mediante transmisión vertical durante períodos epidémicos (Teixeira et al., 2021). Actualmente existe un único reporte en Costa Rica, que investigó la transmisión transovárica en una población de 35 grupos (32 hembras y 3 machos) de mosquitos adultos de *Ae. albopictus* en una plantación de piña en Sarapiquí, determinando la presencia de DENV en un grupo de mosquitos macho (Calderón-Arguedas et al., 2015). Sin embargo, no se han realizado hasta la fecha estudios con larvas *Ae. aegypti*.

El DENV, CHIKV y ZIKV producen manifestaciones clínicas como fiebre, cefalea, mialgia, artralgia, erupción maculopapular, dolor retroorbitario y linfadenopatías y ocasionan un gran impacto a la salud pública, sobre todo en regiones tropicales y subtropicales. (Arredondo-García et al., 2016; Paixão et al., 2018). En Costa Rica, el Ministerio de Salud (MINSA) reportó en el año 2020 un total de 9,438 casos de DENV, donde el cantón de Pérez Zeledón fue el más afectado con 1,245 casos y los serotipos circulantes fueron el DENV1 y DENV2; 49 casos de CHIKV donde el cantón más afectado con siete casos fue Puntarenas y 121 casos de ZIKV donde el cantón más afectado con 12 casos fue Siquirres (Ministerio de Salud, 2020; OPS, 2021).

El presente estudio tuvo como objetivo estimar la diversidad de culícidos y detectar la presencia de los virus Dengue, Chikungunya y Zika en larvas *Ae. aegypti* en Costa Rica.

2. Materiales y métodos

2.1 Diseño del estudio y sitios de muestreo

Se realizó un estudio de tipo transversal y descriptivo. Las giras se realizaron en conjunto con el Ministerio de Salud (MINSAL) en el período de agosto a noviembre del 2021 (4 meses en época lluviosa) a 19 distritos localizados a menos de 900 metros sobre el nivel del mar, en los que históricamente se habían presentado casos de DENV, CHIKV y ZIKV (Buenos Aires, Daniel Flores, San Isidro de El General, Tárcoles, Jacó, La Suiza, Tucurrique, Pavones, Puerto Viejo, La Virgen, El Cairo, Siquirres, Guácimo, Guápiles, Rita y Pital) y en los que se reportaron brotes de arbovirus entre agosto y diciembre del 2021 (Chomes, Turrialba y La Isabel).

2.2 Recolecta de muestra

La recolección de las larvas se llevó a cabo en calles, aceras y playas (seleccionadas al azar), de contenedores con agua estancada y sucia. Las larvas recolectadas se colocaron vivas en recipientes de plástico con agua de su hábitat y se transportaron al laboratorio, en donde se realizó inmediatamente la identificación morfológica.

2.3 Análisis morfológico

Las larvas de los géneros *Aedes* y *Culex* se identificaron a nivel de especie y *Limatus* a nivel de género, utilizando las claves taxonómicas descritas por Ruedas (2004). Una vez identificadas se cuantificaron las larvas por distrito y las larvas *Ae. aegypti* se almacenaron en grupos de 50 larvas a -80 °C hasta el análisis molecular.

2.4 Índices ecológicos de diversidad

Se determinó la diversidad de especies de mosquitos entre las localidades muestreadas, utilizando el índice de similitud de Jaccard. Para analizar la diversidad por localidad se utilizaron los índices de Margalef, Shannon-Weber, Pielou y riqueza específica.

2.4.1 Índice de similitud de Jaccard (ISJ)

Este índice se basa en la relación de presencia y ausencia entre el número de especies comunes en dos áreas (o comunidades) y en el número total de especies, expresando el porcentaje de semejanza entre las comunidades comparadas (Badii et al., 2008). Su fórmula se expresa así:

$$ISJ = [c / (a+b-c)]$$

Donde:

a: número de especies exclusivas de la comunidad A

b: número de especies exclusivas de la comunidad B

c: número de especies comunes para ambas comunidades (A y B)

Los valores que expresa oscilan entre 0 (Ausencia) y 1 (Presencia), donde 0 es cuando no hay especies en común entre las comunidades y 1 cuando comparten las mismas especies.

2.4.2 Índice de Margalef (D_{MG})

Es un indicador de la riqueza específica. 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, 2001). Su fórmula se expresa así:

$$D_{MG}=(S-1)/\ln N$$

Donde:

S: número total de especies

$\ln N$: logaritmo del número total de individuos

La interpretación de este índice indica que valores menores a 2 denotan una baja riqueza de especies y por el contrario valores cercanos a 5 o superiores reflejan una riqueza de especies alta (Mora-DonJuan et al., 2017).

2.4.3 Índice de Shannon-Weaver (H')

Este índice refleja la heterogeneidad de una comunidad sobre la base de dos factores: el número de especies presentes y su abundancia relativa (Pla, 2006; Moreno, 2001). Su fórmula se expresa así:

$$H' = -\sum (P_i)(\ln P_i)$$

Donde:

P_i: Abundancia relativa

lnP_i: Logaritmo natural de la abundancia relativa

Su interpretación consiste, en que en la mayoría de los ecosistemas naturales el índice varía entre 0.5 a 5, se expresa como un número positivo, aunque su valor normal está entre 2 y 3. Valores menor a 2 indican menor diversidad y valores mayores a 3 indican gran diversidad (Mora-DonJuán et al., 2017).

2.4.4 Índice de Pielou (J')

Mide la proporción de la diversidad observada con relación a la máxima diversidad esperada. Su valor va de 0 a 1, donde 0 representa la ausencia de uniformidad y 1 corresponde a situaciones donde todas las especies son igualmente abundantes (Moreno, 2001). Su fórmula se expresa así:

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

Donde:

H': índice de Shannon-Weaver

S: riqueza específica

H'_{max}: ln (S), logaritmo natural de riqueza específica

2.4.5 Riqueza Especifica

Es el número total de especies encontrado en cada localidad.

2.5 Análisis molecular

Las larvas de *Ae. aegypti* se sometieron a extracción de ARN utilizando el ensayo Total RNA Purification Kit (NORGEN), siguiendo las recomendaciones del fabricante. Se midió la calidad y cantidad de ácidos nucleicos extraídos mediante NanoDrop. Seguidamente los grupos de larvas se sometieron a retrotranscripción acoplada a una reacción en cadena de polimerasa en tiempo real (RT-qPCR), siguiendo el protocolo descrito por Waggoner et al. (2016), con el fin de amplificar los segmentos que codifican la región no

traducida 5'(UTR) del gen de la cápside de DENV, la proteína no estructural 2 (NSP2) de CHIKV y la proteína no estructural 4B (NS4B) de ZIKV. Para cada virus se usaron diferentes cebadores y sondas (Cuadro 1). Las reacciones se realizaron en un volumen final de 25 µL, 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 la sonda (10 µM), 0.75 µl de cada iniciador (10 µM), 5 µl de ARN y 5 µl de agua grado biología molecular (Thermo Scientific). Todas las reacciones se analizaron con el QuantStudio 3 Real-Time PCR System. Las condiciones de ciclado consistieron en una desnaturalización inicial a 52°C durante 15 min; 94°C durante 2 minutos y 45 ciclos de 94°C durante 15 segundos, 55°C durante 20 segundos y 68°C durante 20 segundos. Como control positivo se utilizó una extracción de una muestra de cultivo celular de cada uno de los virus, donados por el Instituto Costarricense de Investigación y Enseñanza en Nutrición y Salud (INCIENSA) y como control negativo se utilizó agua libre de nucleasa. Todas las muestras que amplificaron con una curva de crecimiento superando el umbral Ct (calculado automáticamente por el equipo) entre los primeros 45 ciclos se consideraron positivas.

Cuadro 1. Iniciadores y sondas de RT-qPCR en tiempo real para DENV, CHIKV y ZIKV.

Agente	Tamaño	Sonda	Iniciadores
DENV-1	114 pb	Sonda A: CTCGCGCGTTTTCAGCATAT	Forward: CAGATCTCTGATGAACAACCAACG Reverse: TTTGAGAATCTCTTCGCCAAC
DENV-2	85 pb	Sonda B: CTCTCGCGTTTTCAGCATAT	Forward: CAGATCTCTGATGAATAACCAACG Reverse: AGTTGACACGCGGTTTTCTCT Forward: CAGATCTCTGATGAATAACCAACG Reverse: AGTCGACACGCGGTTTTCTCT
DENV-3	114 pb	Sonda C: CTCTCACGTTTTCAGCATATTG	Forward: CAGATTTCTGATGAACAACCAACG Reverse: TTTGAGAATCTCTTCGCCAAC
DENV-4	110 pb	Sonda D: CTCACGCGTTTTCAGCATAT	Forward: GATCTCTGGAAAAATGAAC Reverse: AGAATCTCTTCACCAACC
CHIKV	96 pb	GCGGTGTACACTGCCTGTGACYGC	Forward: CATCTGCACYCAAGTGTACCA Reverse: GCGCATTTTTGCCTTCGTAATG
ZIKV	100 pb	YGTTGTGGATGGAATAGTGG	Forward: CAGCTGGCATCATGAAGAAYC Reverse-1: CACTTGTCCCATCTTCTTCTCC Reverse-2: CACCTGTCCCATCTTTTTTCTCC

3. Resultados

En los 19 distritos se encontraron dos especies de larvas de *Aedes* (*Ae. aegypti* y *Ae. albopictus*), cinco especies de *Culex* (*Culex coronator*, *Culex corniger*, *Culex*

quinquefasciatus, *Culex nigripalpus* y *Culex interrogator*) y larvas del género *Limatus*. El número de larvas encontradas en los diferentes distritos se muestra en el Cuadro 2.

Cuadro 2. Identificación y cuantificación de las especies de larvas de *Aedes*, *Culex* como larvas de género *Limatus* en 19 distritos de Costa Rica, agosto-noviembre 2021.

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

Los distritos de Guácimo y La Virgen fueron los que tuvieron mayor diversidad de larvas debido a que se recolectó 6 de 8 especies de mosquitos (Cuadro 2).

Al realizar la comparaciones entre los distritos de Buenos Aires y Guápiles, Chomes y Cairo, Jacó y La Suiza, Jacó y Pital, La Suiza y Pital, obtuvieron valor de 1 con el índice de similitud de Jaccard; esto se debe a que estos distritos comparten las mismas especies de culícidos (Cuadro 3).

Cuadro 3. Porcentaje de similitud y diferencias en la distribución de las larvas encontradas utilizando índice de similitud de Jaccard en los 19 distritos de Costa Rica, agosto-noviembre 2021.

	Daniel Flores	San Isidro de El General	Chomes	Tárcoles	Puerto Viejo	La Virgen	Cairo	Guácimo	Guápiles	La Rita	Jacó	La Isabel	Turrialba	La Suiza	Pavones	Tucurrique	Siquirres	Pital
Buenos Aires	0.6	0.67	0.6	0.5	0.5	0.5	0.6	0.5	1	0.75	0.33	0.4	0.33	0.33	0.2	0.5	0.25	0.33
Daniel Flores		0.4	0.43	0.33	0.6	0.83	0.43	0.57	0.6	0.8	0.2	0.29	0.43	0.2	0.6	0.33	0.4	0.2
San Isidro de El General			0.4	0.67	0.67	0.33	0.4	0.33	0.67	0.5	0.5	0.2	0.17	0.5	0.25	0.25	0.33	0.5
Chomes				0.6	0.33	0.57	1	0.57	0.6	0.5	0.2	0.5	0.43	0.2	0.14	0.6	0.17	0.2
Tárcoles					0.5	0.5	0.6	0.5	0.5	0.4	0.33	0.4	0.33	0.33	0.2	0.5	0.25	0.33
Puerto Viejo						0.5	0.33	0.5	0.5	0.75	0.33	0.17	0.14	0.33	0.5	0.2	0.67	0.33
La Virgen							0.57	0.71	0.5	0.67	0.17	0.43	0.57	0.17	0.5	0.5	0.33	0.17
Cairo								0.57	0.6	0.5	0.2	0.5	0.43	0.2	0.14	0.6	0.17	0.2
Guácimo									0.5	0.67	0.17	0.67	0.57	0.17	0.29	0.5	0.33	0.17
Guápiles										0.75	0.33	0.4	0.33	0.33	0.2	0.5	0.25	0.33
La Rita											0.25	0.33	0.29	0.25	0.4	0.4	0.5	0.25
Jacó												0.25	0.2	1	0.33	0.33	0.5	1
La Isabel													0.8	0.25	0.17	0.75	0.2	0.25
Turrialba														0.2	0.33	0.6	0.17	0.2
La Suiza															0.33	0.33	0.5	1
Pavones																0.2	0.67	0.33
Tucurrique																	0.25	0.33
Siquirres																		0.5

Los distritos de La Virgen y Guácimo fueron los que presentaron mayor riqueza específica y diversidad de especies, debido a que se identificaron seis especies en cada comunidad y obtuvieron los mayores valores de índices de Margalef (La Virgen: 0.81, Guácimo: 0.80) y Shannon-Weber (La Virgen: 1.26, Guácimo: 1.30). Los valores menores se encontraron en los distritos de Pital, Jacó y La Suiza en donde solo se identificó una especie, indicando una baja diversidad de especies mientras que el índice de Pielou estableció el distrito de Pavones como el distrito que presentó mayor equitatividad en la distribución de las especies con 0.89 (Cuadro 4).

Cuadro 4. Valores de riqueza específica e índices de Margalef, Shannon-Weber y Pielou en los 19 distritos analizados.

Distrito	Riqueza específica	Índice Margalef	Índice Shannon-Weber	Índice Pielou
Buenos Aires	3	0.48	0.81	0.74
Daniel Flores	5	0.89	1.10	0.68
San Isidro de El General	2	0.20	0.33	0.48

Chomes	5	0.63	0.78	0.48
Tárcoles	3	0.30	0.90	0.82
Puerto Viejo	3	0.31	0.68	0.62
La Virgen	6	0.81	1.26	0.70
El Cairo	5	0.67	1.24	0.77
Guácimo	6	0.80	1.30	0.73
Guápiles	3	0.41	0.86	0.78
Rita	4	0.54	1.10	0.79
Jacó	1	0.00	0.00	0.00
La Isabel	4	0.76	0.95	0.69
Turrialba	5	0.77	1.09	0.68
La Suiza	1	0.00	0.00	0.00
Pavones	3	0.63	0.92	0.84
Tucurrique	3	0.50	0.35	0.32
Siquirres	2	0.25	0.21	0.30
Pital	1	0.00	0.00	0.00

En los 19 distritos, se recolectaron e identificaron larvas *Ae. aegypti* en 20 de 26 localidades (Cuadro 5). Cuatro localidades (Punta Morales, Carmen La Lira, Barrio La Margot y La Mora) presentaron brotes de DENV en el momento de la recolecta de larvas, mientras que las restantes 22 localidades fueron lugares, en los que se habían reportado previamente casos de DENV, CHIKV y ZIKV (Cuadro 5).

Cuadro 5. Cantidad de larvas *Ae. aegypti* encontradas y número de grupos analizadas mediante RT-qPCR para DENV, ZIKV y CHIKV en 19 distritos de Costa Rica.

Distrito	Localidad	Cantidad de larvas <i>Ae. aegypti</i> encontradas	Cantidad de grupos de larvas analizadas
Buenos Aires	Buenos Aires	30	1
Daniel Flores	Concepción	2	1
San Isidro de El General	San Isidro de El General	134	3
Chomes	Punta Morales	429	9

Tárcoles	Playa Azul	370	8
Tárcoles	Tárcoles	150	3
Jacó	Jacó	233	5
Turrialba	Barrio La Margot*	76	2
Turrialba	Carmen La Lira*	30	1
La Isabel	La Mora*	34	1
La Suiza	La Suiza	180	4
Tucurrique	Tucurrique	50	1
Pavones	Eslabón	4	1
Puerto Viejo	Barrio El Naranjal 1	428	9
Puerto Viejo	Barrio El Naranjal 2	50	1
La Virgen	La Chilera	219	5
El Cairo	Cairo	185	4
Siquirres	San Rafael	23	1
Siquirres	San Martin	28	1
Guácimo	Afriquita	74	2
Guácimo	La Selva	7	1
Guácimo	La Angelina	192	4
Guápiles	Diamante	49	1
Rita	La Rita	98	2
Pital	Pital	113	3
Total		3188	74

* Localidades con brote de DENV.

Del total de 74 grupos de larvas de *Ae. aegypti* analizadas por RT-qPCR, ninguno resultó positivo para DENV, CHIKV y ZIKV (Figura 1, 2 y 3, respectivamente).

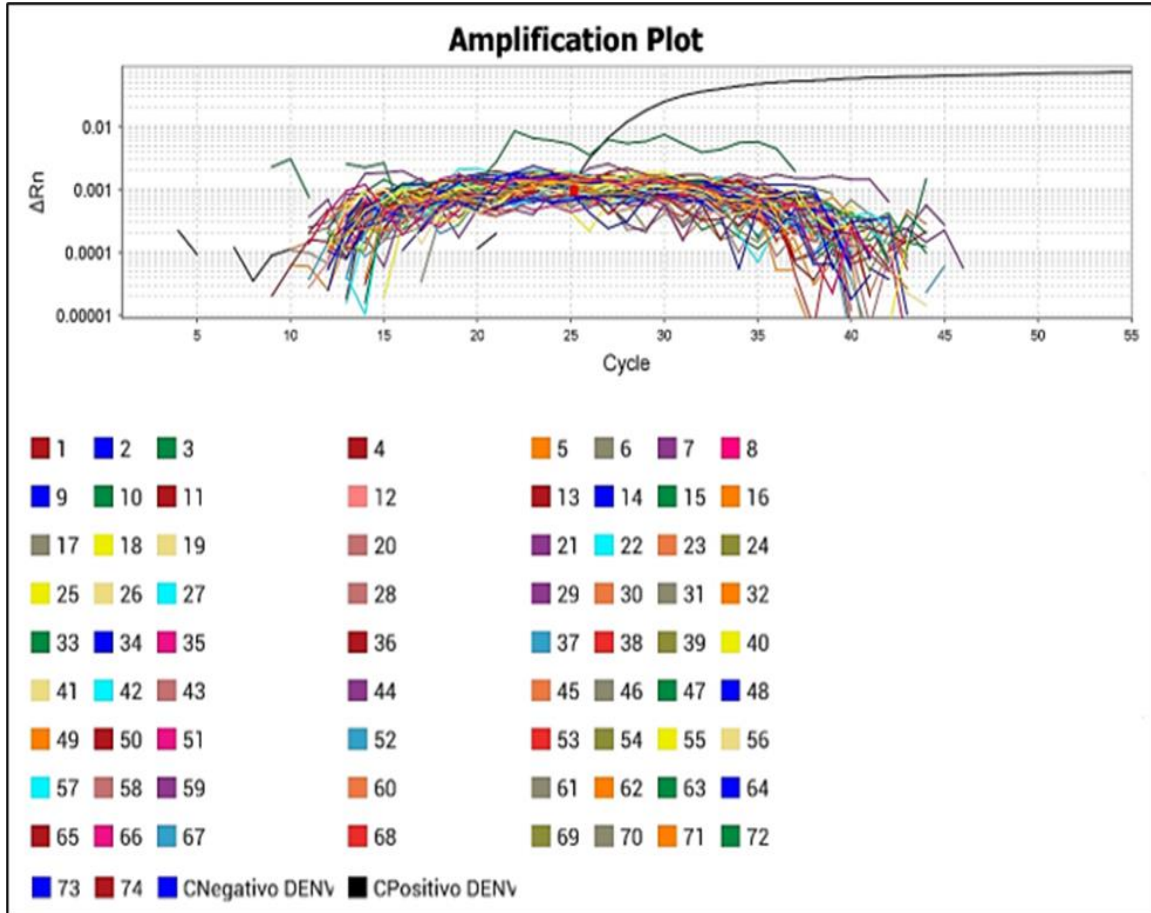


Figura 1. Resultados de los 74 grupos de larvas analizadas por RT-qPCR para detección de DENV, curva negra: control positivo DENV.

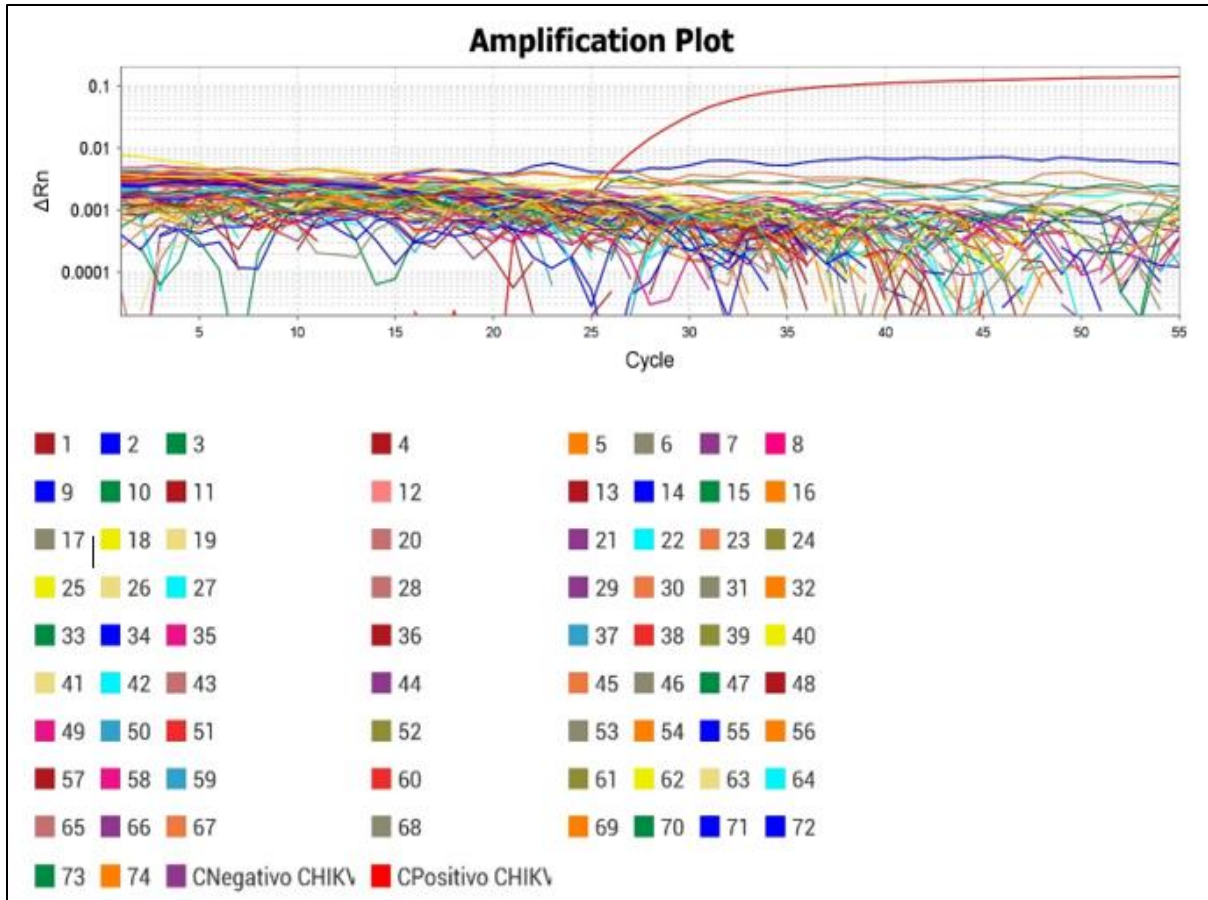


Figura 2. Resultados de los 74 grupos de larvas analizadas por RT-qPCR para detección de CHIKV, curva roja: control positivo CHIKV.

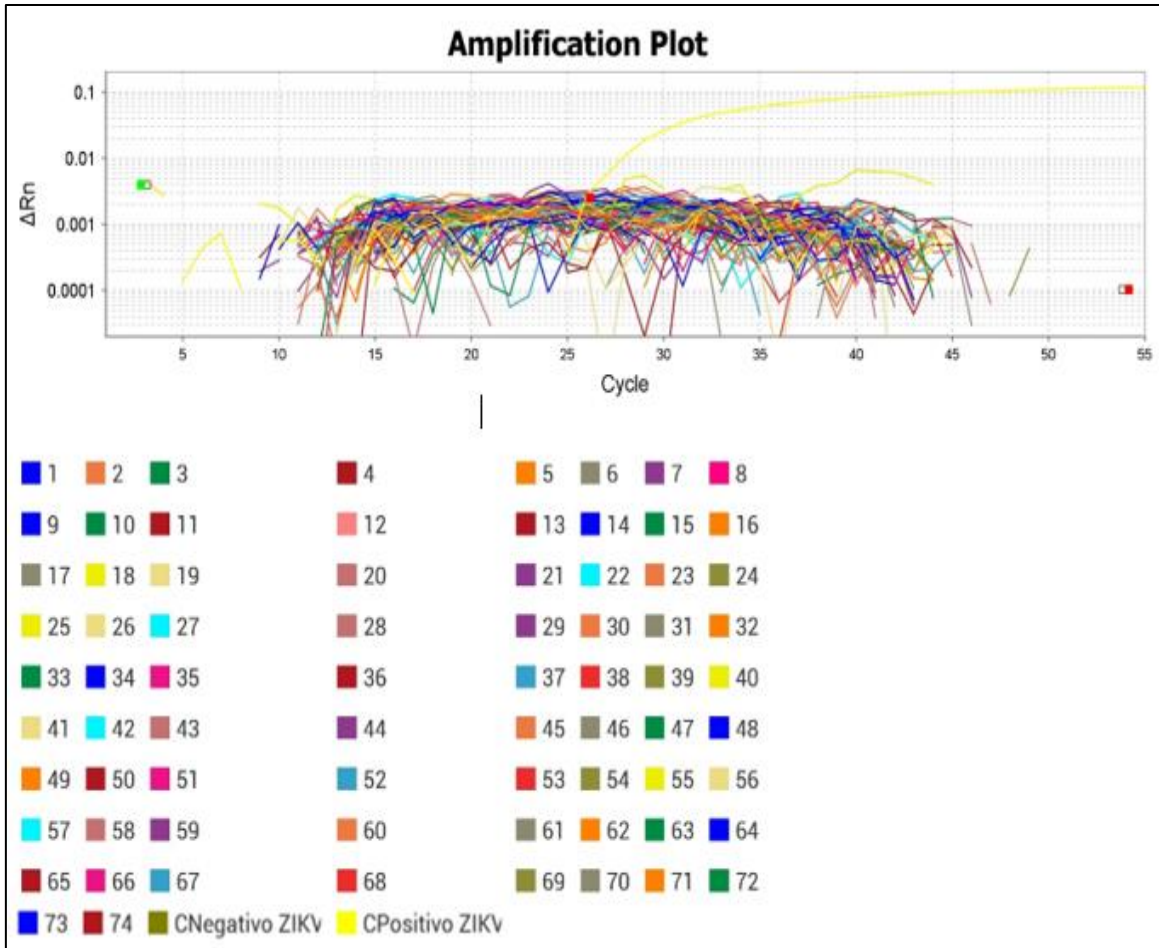


Figura 3. Resultados de los 74 grupos de larvas analizadas por RT-qPCR para detección de ZIKV, curva amarilla: control positivo ZIKV.

4. Discusión

Conocer la biodiversidad de mosquitos presentes en un ecosistema o localidades, es importante, para establecer la dispersión de especies autóctonas y detectar especies invasivas fuera de los rangos geográficos originales. Además, estos estudios entomológicos periódicos permiten actualizar la información sobre la diversidad, la riqueza de especies y la abundancia de mosquitos hematófagos, sobre todo en áreas, que están sufriendo cambios debido al calentamiento global o al urbanismo, con el propósito de poder medir el riesgo para prevenir enfermedades transmitidas por mosquitos, que fue el objetivo del presente trabajo (Casas-Martínez et al., 2012). La especie de larva de mosquito mayormente recolectada en la presente investigación fue

Ae. aegypti. La predominancia de esta especie sobre las otras se debe a que tiene un comportamiento sinantrópico, esta especie se adapta fácilmente a múltiples criaderos y a cambios climáticos (diapausa), lo que favorece el establecimiento de focos endémicos (Kweka et al., 2018). La dominancia de esta especie ya se había reportado en estudios previos en Costa Rica (Calderón-Arguedas et al., 2004; Marín et al., 2009). Además, se ha observado que esta especie puede convivir con otros mosquitos, compartir el mismo hábitat y recursos, lo cual podría deberse a un solapamiento de nicho sin descartarse la posibilidad de competencia interespecífica (Marquetti, 2006). Los distritos de Guácimo y La Virgen fueron las comunidades donde se encontró la mayor riqueza de especies (6) y los resultados similares entre los dos distritos podría deberse a las características similares que poseen ambos distritos por la corta distancia (72 km) que hay entre ellas, una temperatura que oscila entre 27°- 30°C, un clima tropical húmedo con abundantes lluvias y precipitación pluvial de hasta 300 mm mensual (Barrientos & Chaves, 2008; MEP., s.f.).

La mayoría de los distritos analizados mostraron poca riqueza y diversidad de especies (menos de seis especies), y tres distritos (Jacó, La Suiza y Pital) presentaron solamente una especie (*Ae. aegypti*). Esto podría deberse a que los sitios visitados son de ecosistemas deforestados y desérticos (más urbanizados) dando lugar a comunidades dominadas por mosquitos adaptados a entornos urbanos, causando que especies locales sean desplazadas y aumentando así el riesgo de propagación de arbovirus. La escasez de recursos y hábitats podría favorecer que algunos mosquitos con adaptabilidad a estos entornos podrían ser los únicos en desarrollarse y convertirse en adultos (Lee et al., 2019). El diseño de estudio de la toma de muestra fue al azar y no sistemático, lo que también pudo afectar el registro de especies por falta de esfuerzo de muestreo, influyendo en la cantidad de especies identificadas (Dousdebes, 2017). De todos los distritos visitados, Pavones presentó el índice de Pielou más alto (0.84), esto significa que sus especies se encuentran distribuidas con mayor equidad, lo contrario sucede en los distritos de Tucurrique (0.30) y Siquirres (0.32). Esto demuestra que la distribución de la diversidad de un ecosistema o una comunidad puede verse afectado por factores como la actividad antropogénica (mayor urbanización), cambios ambientales

(deforestación) y climáticos, lo que ocasiona que algunas especies de mosquitos proliferen y estén en mayor abundancia mientras que otras en menor cantidad (Almeida et al., 2020). Se recomienda realizar vigilancia entomológica, no solo para el mosquito *Aedes* spp., sino también para otras especies hematófagas, que son de importancia médica, debido a que también pueden transmitir enfermedades, como es el caso del mosquito *Culex* spp. En este estudio se identificaron 5 especies (*C. coronator*, *C. corniger*, *C. quinquefasciatus*, *C. nigripalpus* y *C. interrogator*) y este mosquito se ha implicado como el vector biológico de la filariasis (*Wuchereria bancrofti*), de la que se han reportado casos en Costa Rica en 1954 en Puerto Limón (Calderón-Arguedas et al., 2009; Lieske, 1954). Además, este vector consume sangre, tanto de animales como de humanos por lo tanto se ha asociado como vector mecánico del virus de oeste del Nilo, virus de la encefalitis de Saint Louis y virus de la encefalitis equina del este (Calderón-Arguedas et al., 2009). Estos virus son endémicos en Costa Rica y se han reportado casos en caballos, animales domésticos y salvajes (Romero-Vega et al., 2022).

El no haber logrado detectar arbovirus en los 74 grupos de larvas, podría deberse, por un lado a que solamente se analizaron un 17% (13 grupos) de larvas de zonas con brotes y los restantes grupos fueron de localidades en las que en el pasado se habían reportado brotes. Por el otro lado, se ha reportado, que las tasas de transmisión transovárica ocurren en niveles bajos en la naturaleza (da Costa et al., 2017; Lequime & Lambrechts, 2014). En estudios realizados a nivel experimental, se determinó que la tasa de transmisión transovárica debía ser de un 5-26% para que los arbovirus persistieran en las siguientes generaciones, pero en una infección natural se cree que esto no sea mayor (Zeidler et al., 2008) por lo tanto, si se recogen muestras en el campo solo un porcentaje pequeño (1-4%) de los individuos analizados posiblemente se encuentren infectados por arbovirus (Adams & Boots, 2010). Por otro lado, no toda población de mosquitos adultos se infecta de forma horizontal (de un huésped virémico), incluso durante una epidemia, ya que en la naturaleza menos del 20% de mosquitos hembra se infectarán (Joshi et al., 2002). El número de infecciones en la población de larvas parece ser muy pequeño, además la población de larvas infectadas verticalmente se reducirá considerablemente con cada generación sucesiva (Adams & Boots, 2010). Se cree que la transmisión

transovárica ocurre a un ritmo muy bajo, y que la reintroducción de arbovirus a regiones libres se deba más bien por el ingreso de personas infectadas a un área. La transmisión vertical parece contribuir a la persistencia de arbovirus en una comunidad en un plano secundario a la transmisión horizontal (Zeidler et al., 2008).

5. Conclusiones

- La especie de mosquito *Ae. aegypti* fue la especie que se encontró en forma predominante en los 19 distritos analizados.
- Los distritos que mostraron mayor riqueza y diversidad de mosquitos fueron Guácimo y La Virgen con seis de ocho especies identificadas (*Ae. aegypti*, *Ae. albopictus*, *Culex coronator*, *Culex corniger*, *Culex quinquefasciatus*, *Culex nigripalpus*, *Culex interrogator* y solo género *Limatus*), mientras que en Jacó, La Suiza y Pital solamente se detectó una especie (*Ae. aegypti*).
- El distrito de Pavones presentó mayor equitatividad en la distribución de las especies.
- Se encontraron especies de mosquitos que son potenciales vectores de enfermedades que podrían representar riesgos para la salud humana y animal.
- No se logró detectar la presencia de los virus del DENV, CHIKV y ZIKV en larvas *Ae. aegypti*.

6. Recomendaciones

- Realizar muestreos sistemáticos y periódicos para monitorear la presencia, densidad y comportamiento de los vectores en localidades representativas con brote y endémicas.
- Mantener la vigilancia de otras especies hematófagas para prevenir otras patologías que podrían estar afectando a humanos y animales.

7. Referencias Bibliográficas

Adams, B., & Boots, M. (2010). How important is vertical transmission in mosquitoes for the persistence of dengue? Insights from a mathematical model. *Epidemics*, 2(1), 1-10.
<https://doi.org/10.1016/j.epidem.2010.01.001>

Agarwal, A., Parida, M., & Dash, P. K. (2017). Impact of transmission cycles and vector competence on global expansion and emergence of arboviruses. *Reviews in medical virology*, 27(5), e1941. <https://doi.org/10.1002/rmv.1941>

Almeida, J. F., Belchior, H. C. M., Ríos-Velásquez, C. M., & Pessoa, F. A. C. (2020). Diversity of mosquitoes (Diptera: Culicidae) collected in different types of larvitrap in an Amazon rural settlement. *Plos one*, 15(10), e0235726. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0235726>

Arredondo-García, J. L., Méndez-Herrera, A., & Medina-Cortina, H. (2016). Arbovirus en Latinoamérica. *Acta pediátrica de México*, 37(2), 111-131. <http://doi.org/10.18233/APM37No2pp111-131>

Badii, M. H., Landeros, J., & Cerna, E. (2008). Patrones de asociación de especies y sustentabilidad. *Revista Daena (International Journal of Good Conscience)*, 3(1). <http://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:XKtFOdl9CEgJ:www.spentamexico.org/v3-n1/3%25281%2529%2520632-660.pdf+&cd=1&hl=es-419&ct=clnk&gl=cr&client=firefox-b-d>

Barrientos, O., Chaves, G. (2008). Región Huetar Norte: Oferta exportada actual y oferta potencial de productos agropecuarios alternativos. <http://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:voWzQd9IFoJ:www.mag.go.cr/bibliotecavirtual/E71-10543.pdf+&cd=1&hl=es-419&ct=clnk&gl=cr&client=firefox-b-d>

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. https://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0717-77122004000300007

Calderón Arguedas, O., Troyo, A., Solano, M. E., & Avendaño, A. (2009). Culícido fauna asociada con contenedores artificiales en la Comunidad " La Carpio", Costa Rica. *Revista*

Costarricense de Salud Pública, 18(1), 30-36.
https://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1409-14292009000100006

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.
https://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-77442009000400025

Calderón-Arguedas, O., Troyo, A., Moreira-Soto, R. D., Marín, R., & Taylor, L. (2015). Dengue viruses in *Aedes albopictus* Skuse from a pineapple plantation in Costa Rica. *Journal of Vector Ecology*, 40(1), 184-186. <https://doi.org/10.1111/jvec.12149>

Casas-Martínez, M., Orozco-Bonilla, A., & Bond-Campeán, J. G. (2012). Diversidad y distribución geográfica de las especies de culícidos de importancia médica en la región centro-occidental de México. Instituto Nacional de Salud Pública.
<https://doi.org/10.15468/a7qyue>

Chouin-Carneiro, T., & dos Santos, F. B. (2017). Transmission of major arboviruses in Brazil: the role of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* vectors. *Biological Control of Pest and Vector Insects*, 2. <https://doi.org/10.5772/66946>

da Costa, C. F., Dos Passos, R. A., Lima, J. B. P., Roque, R. A., de Souza Sampaio, V., Campolina, T. B., Secundino, N. F. C., Pimenta, P. F. P. (2017). Transovarial transmission of DENV in *Aedes aegypti* in the Amazon basin: a local model of xenomonitoring. *Parasites & Vectors*, 10(1), 1-9. <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2194-5>

Dousdebes, C. (2017). Estudio del impacto ambiental y plan de manejo ambiental para el desarrollo, construcción, mantenimiento de instalaciones; el dragado, construcción y mantenimiento de un canal de navegación hasta Posorja en la provincia del Guayas; y la operación del servicio público del puerto de Aguas Profundas de Posorja, ubicado en la

provincia del Guayas. <https://es.scribd.com/document/477155638/0000-Dosudebes-2016-Tabla-Shannon>

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), 1-8. <https://doi.org/10.1186/s13071-018-2643-9>

Foley, D. H., Rueda, L. M., & Wilkerson, R. C. (2007). Insight into global mosquito biogeography from country species records. *Journal of Medical Entomology*, 44(4), 554-567. [https://doi.org/10.1603/0022-2585\(2007\)44\[554:iigmbf\]2.0.co;2](https://doi.org/10.1603/0022-2585(2007)44[554:iigmbf]2.0.co;2)

Izquierdo-Suzán, M., Zárate, S., Torres-Flores, J., Correa-Morales, F., González-Acosta, C., Sevilla-Reyes, E. E., Lira, R., Alcaraz-Estrada, S.L., Yocupicio-Monroy, M. (2019). Natural vertical transmission of Zika virus in larval *Aedes aegypti* populations, Morelos, Mexico. *Emerging infectious diseases*, 25(8), 1477. <https://doi.org/10.3201/eid2508.181533>

Joshi, V., Mourya, D. T., & Sharma, R. C. (2002). Persistence of dengue-3 virus through transovarial transmission passage in successive generations of *Aedes aegypti* mosquitoes. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 67(2), 158-161. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2002.67.158>

Kweka, E. J., Baraka, V., Mathias, L., Mwang'onde, B., Baraka, G., Lyaruu, L., & Mahande, A. M. (2018). Ecology of *Aedes* mosquitoes, the major vectors of arboviruses in human population. *Dengue Fever-a Resilient Threat Face Innov.* <http://doi.org/10.5772/intechopen.81439>

Lee, J. M., Wasserman, R. J., Gan, J. Y., Wilson, R. F., Rahman, S., & Yek, S. H. (2020). Human activities attract harmful mosquitoes in a tropical urban landscape. *EcoHealth*, 17(1), 52-63. <https://doi.org/10.1007/s10393-019-01457-9>

Lequime, S., & Lambrechts, L. (2014). Vertical transmission of arboviruses in mosquitoes: a historical perspective. *Infection, Genetics and Evolution*, 28, 681-690. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2014.07.025>

Lieske, H. (1954). Filariasis en Puerto Limón, Costa Rica. *Revista de Biología Tropical*, 2(1), 37-44. <https://revistas.ucr.ac.cr/index.php/rbt/article/view/28832>

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. <http://doi.org/10.1590/1414-431X20198339>

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. <https://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumen.cgi?IDARTICULO=22081>

Marquetti, M. C. (2006). Aspectos bioecológicos de importancia para el control de *Aedes aegypti* y otros culícidos en el ecosistema urbano. Ciudad de La Habana: Instituto de Medicina Tropical Pedro Kourí. <https://docplayer.es/14938769-Aspectos-bioecologicos-de-importancia-para-el-control-de-aedes-aegypti-y-otros-culicidos-en-el-ecosistema-urbano.html>

Ministerio de Educación Pública. (s.f.). Huetar Atlántica. Ministerio de Educación Pública (MEP). Recuperado de <https://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:Z8gx-KjCZ8oJ:https://www.mep.go.cr/sites/default/files/recursos/recursos-interactivos/regiones/pdf/hatlantica.pdf+&cd=3&hl=es-419&ct=clnk&gl=cr&client=firefox-b-d>

Ministerio de Salud. (2020). Análisis de situación de salud. <https://www.ministeriodesalud.go.cr/index.php/vigilancia-de-la-salud/analisis-de-situacion-de-salud>

Mora-Donjuán, C. A., Burbano-Vargas, O. N., Méndez-Osorio, C., & Castro-Rojas, D. F. (2017). Evaluación de la biodiversidad y caracterización estructural de un Bosque de Encino (*Quercus L.*) en la Sierra Madre del Sur, México. *Revista Forestal Mesoamericana Kurú*, 14(35), 68-75. <https://doi.org/10.18845/rfmk.v14i35.3154>

Moreno, C. E. (2001). Métodos para medir la biodiversidad (Volumen 1, 1^{ra} ed). https://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-77442001000300090

Morris, E. K., Caruso, T., Buscot, F., Fischer, M., Hancock, C., Maier, T. S., Meiners, T., Müller, C., Obermaier, E., Prati, D., Socher, S.A., Sonnemann, I., Wäschke, 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>

Nikookar, S. H., Moosa-Kazemi, S. H., Oshaghi, M. A., Vatandoost, H., Yaghoobi-Ershadi, M. R., Enayati, A. A., Motevali-Haghi, F., Ziapour, S.P., Fazeli-Dinan, M. (2015). Biodiversity of culicid mosquitoes in rural Neka township of Mazandaran province, northern Iran. *Journal of vector borne diseases*, 52(1), 63. https://www.researchgate.net/publication/274259216_Biodiversity_of_culicid_mosquitoes_in_rural_Neka_township_of_Mazandaran_province_northern_Iran

OPS. (2021). Actualización Epidemiológica: Arbovirosis en el contexto de COVID-19. <https://www.paho.org/es/documentos/actualizacion-epidemiologica-arbovirosis-contexto-covid-19-2-julio-2021>

Paixão, E. S., Teixeira, M. G., & Rodrigues, L. C. (2018). Zika, chikungunya and dengue: the causes and threats of new and re-emerging arboviral diseases. *BMJ global health*, 3(Suppl 1), e000530. <https://doi.org/10.1136/bmjgh-2017-000530>

Pla, L. (2006). Biodiversidad: Inferencia basada en el índice de Shannon y la riqueza. *Interciencia*, 31(8), 583-590. http://www.scielo.org.ve/scielo.php?pid=S0378-18442006000800008&script=sci_arttext

Romero-Vega, L. M., Piche-Ovares, M., Soto-Garita, C., Murillo, D. F. B., Chaverri, L. G., Alfaro-Alarcón, A., Corrales-Aguilar, E., & Troyo, A. (2022). Seasonal changes of mosquito communities structure in two endemic regions for arboviruses in Costa Rica: Species richness, diversity, bloodmeal preferences and viral positivity. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-1991817/v1>

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. <http://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000527>

Teixeira, A. F., de Brito, B. B., Correia, T. M. L., Viana, A. I. S., Carvalho, J. C., da Silva, F. A. F., & de Melo, F. F. (2021). Simultaneous circulation of Zika, Dengue, and Chikungunya viruses and their vertical co-transmission among *Aedes aegypti*. *Acta Tropica*, 215, 105819. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2020.105819>

Thongrungrat, S., Maneekan, P., Wasinpiyamongkol, L., & Prummongkol, S. (2011). Prospective field study of transovarial dengue-virus transmission by two different forms of *Aedes aegypti* in an urban area of Bangkok, Thailand. *Journal of Vector Ecology*, 36(1), 147-152. <https://doi.org/10.1111/j.1948-7134.2011.00151.x>

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

Zeidler, J. D., Acosta, P. O. A., Barrêto, P. P., & Cordeiro, J. D. S. (2008). Dengue virus in *Aedes aegypti* larvae and infestation dynamics in Roraima, Brazil. *Revista de saude publica*, 42, 986-991. <https://doi.org/10.1590/s0034-89102008005000055>

Artículo 2

Variabilidad genética de larvas *Aedes aegypti* en Costa Rica

Resumen

El mosquito *Aedes aegypti* se considera el vector principal de los virus de dengue (DENV), chikungunya (CHIKV) y Zika (ZIKV). Aunque la distribución de este mosquito es mundial, se encuentra sobre todo en regiones tropicales y subtropicales, impactando la salud pública y la carga económica de los hospitales. Para su control es indispensable conocer los patrones de dispersión y propagación, como factores que facilitan la invasión y adaptación a nuevos entornos. Se cree, que cambios genéticos en el insecto, podrían facilitar la invasión y adaptación a nuevos entornos, por lo que resulta importante estudiar la diversidad genética de estos mosquitos. El objetivo del presente trabajo fue determinar la variabilidad genética de poblaciones de larvas *Ae. aegypti* en diferentes localidades de Costa Rica. En el período de agosto a noviembre del 2021 se recolectaron y clasificaron taxonómicamente larvas de *Ae. aegypti*, en 26 localidades de 19 distritos, seguidamente una larva por localidad se sometió a extracción de ADN y análisis molecular (reacción en cadena de polimerasa convencional del gen mitocondrial de la citocromo oxidasa I y secuenciación). *Aedes aegypti* se encontró en 20 de las 26 localidades y en los 19 distritos muestreados. En total se determinaron tres haplotipos (H1, H2 y H3). El haplotipo 1 fue el más abundante y el que presentó mayor distribución, encontrándose en 16 localidades, mientras que los haplotipos 2 y 3 se encontraron en una y tres localidades, respectivamente. Los tres haplotipos presentaron 15 sitios polimórficos, tres de los sitios polimórficos afectaron la secuencia de los aminoácidos. El haplotipo 1 y 2 han sido reportados hasta la fecha solo en Centroamérica y Panamá, mientras que el haplotipo 3 había sido encontrado previamente en Siquirres y se ha reportado presente en Canadá, Nueva Caledonia y Alemania. Se recomienda realizar estudios sistemáticos de haplotipos de *Ae. aegypti* con un mayor número de muestras a analizar por distrito o localidad, y en diferentes estaciones climáticas, para determinar el haplotipo más frecuente y establecer si el país muestra alta o baja diversidad genética de *Ae. aegypti*.

Palabras clave

Arbovirus, reacción en cadena de polimerasa, haplotipos, sitios polimórficos, filogenia.

Abstract

The *Aedes aegypti* mosquito is considered the main vector of dengue (DENV), chikungunya (CHIKV) and Zika (ZIKV) viruses. The distribution of this mosquito is worldwide, however, it is found mainly in tropical and subtropical regions, impacting public health and causing an economic burden to hospitals. In order to implement control strategies, it is essential to know the patterns of dispersion and propagation of *Ae. aegypti*, and to investigate factors that facilitate the invasion and adaptation to new environments. It is believed that genetic changes in the insect could facilitate adaptation and invasion to new environments, which is why it is important to study the genetic diversity of these mosquitoes. The objective of the present work was to determine the genetic variability of populations of *Ae. aegypti* in different localities of Costa Rica. In the period from August to November 2021, *Ae. aegypti*, was collected in 26 locations in 19 districts, one larva per location were analyzed by molecular techniques (DNA extraction, polymerase chain reaction of the mitochondrial gene of the cytochrome oxidase and sequencing). *Aedes aegypti* was found in 20 of the 26 localities and in the 19 sampled districts. Three haplotypes (H1, H2 and H3) were determined. Haplotype 1 was the most abundant and the one with the greatest distribution, found in 16 locations, while haplotypes 2 and haplotype 3 were found in one and three locations, respectively. The three haplotypes presented 15 polymorphic sites, three of the polymorphic sites affected the amino acid sequence. Haplotype 1 and 2 have been reported to date only in Central America and Panama, while haplotype 3 had previously been found in Siquirres and has been reported to be present also in Canada, New Caledonia, and Germany. It is recommended to perform systematic studies of haplotypes of *Ae. aegypti*, with a greater number of samples to be analyzed by district or locality, and in different climatic seasons, to determine the most frequent haplotypes and establish whether the country shows high or low genetic diversity of *Ae. aegypti*.

Keywords

Arboviruses, polymerase chain reaction, haplotypes, polymorphic sites, phylogeny.

1. Introducción

El mosquito *Aedes aegypti* se considera el vector principal de los virus de dengue (DENV), chikungunya (CHIKV) y Zika (ZIKV). Aunque la distribución del mosquito es mundial, se encuentra sobre todo en regiones tropicales y subtropicales, impactando la salud pública y la carga económica de los hospitales (Cadavid et al., 2015). Para prevenir o reducir estas arbovirosis en una región, la Organización Panamericana de la Salud (OPS) recomienda controlar los vectores, es decir reducir la población de mosquitos para así disminuir o evitar la transmisión a las personas (Tapia-López et al., 2019). Para el control de los mosquitos *Ae. aegypti* también es indispensable conocer sus patrones de dispersión, como se propagan en el medio ambiente y conocer factores que facilitan su invasión y adaptación a nuevos entornos. Se hipotetiza, que cambios genéticos en el insecto, podrían facilitar la invasión y adaptación a nuevos entornos, por lo que resulta importante estudiar la diversidad genética de estos mosquitos y asociar estos cambios a patrones de dispersión, invasión y adaptación (Bennett et al., 2016). El mosquito *Ae. aegypti* proviene del continente africano, desde donde se distribuyó a nivel mundial. En los años 1500-1700, con la colonización europea, el mosquito fue introducido en el continente americano y se logró distribuir desde regiones selváticas tropicales a localidades urbanas, adaptándose a una forma doméstica y antropofílica (Arredondo-García et al., 2016; Salgueiro et al., 2019). Entre 1950-1960, el continente americano logró erradicar este vector, gracias a campañas de control lideradas por la OPS, sin embargo ya a finales de los 70, hubo un crecimiento urbano y poblacional acelerado, auge migratorio y cambio climático (fenómeno del Niño), que ocasionó un descontrol vectorial, causando la reinfestación de América Latina con este mosquito (Morice et al., 2010; Pérez et al., 2019). El primer caso de Dengue se reportó otra vez en Costa Rica en el año de 1993 (Morice et al., 2010), mientras que los primeros casos de Chikungunya (CHIKV) y Zika (ZIKV) en el 2014 y 2016, respectivamente (Corrales-Aguilar et al., 2015; Corrales Aguilar & Soto, 2016).

El estudio del ADN mitocondrial (mtDNA) se ha utilizado para investigar diferencias genéticas y flujo de genes (Costa-da-Silva et al., 2005), proporcionando información sobre como los componentes socioambientales y la intromisión humana (urbanización) podrían estar alternando tanto la estructura poblacional como la dispersión del mosquito *Ae. aegypti* (Scarpassa et al., 2008), que son importantes para el diseño de protocolos de control y estudios epidemiológicos (Cevallos et al., 2019; Naim et al., 2020). Así en varios países del mundo se ha evidenciado que la variabilidad genética y el flujo de genes entre una misma especie, es responsable de diferentes tasas de transmisión de arbovirus (Gandhi et al, 2020). Un estudio realizado en Tailandia demostró que las poblaciones de mosquitos analizadas en áreas urbanas fueron panmícticas mientras que las de las áreas rurales se encontraban más diferenciadas concluyendo a que se debía posiblemente a la disponibilidad de múltiples criaderos para que la hembra oviposite, favoreciendo un hábitat adecuado para su dispersión. Un estudio en Camboya encontró una reducción de la diversidad genética en poblaciones de mosquitos por factores naturales (disponibilidad de hábitats) y factores humanos (uso de insecticidas) (Urdaneta-Marquez & Failloux, 2011). En Senegal un estudio demostró que poblaciones domésticas de *Ae. aegypti* tienden a tener menor diversidad y diferenciación genética en comparación con poblaciones selváticas de este mosquito (Huber et al., 2008).

Estudios en Sudamérica han determinado alta variabilidad genética de *Ae. aegypti*, que podrían ocasionar cambios en el comportamiento de picadura, nivel de antropofilia, capacidad y competencia vectorial, resistencia a insecticidas y otros aspectos relevantes en la transmisión de patógenos (Valencia, 2018). En Brasil se establecieron niveles reducidos en el flujo de genes entre las poblaciones de *Ae. aegypti* y marcadas diferencias genéticas entre las poblaciones, lo cual relacionaron con la reducción de las poblaciones debido al uso excesivo de insecticidas durante las campañas de control vectorial (Sousa et al., 2017). Los únicos estudios que existen en Costa Rica sobre diversidad genética de *Ae. aegypti* se realizaron con especímenes de Siquirres, determinando similitudes con especímenes de América del Norte y del Sur (Gloria-Soria et al., 2016). En un estudio realizado en EUA, utilizaron muestras procedentes de Siquirres, Costa Rica; el análisis determinó la presencia de haplotipos A y G en Siquirres;

donde el haplotipo A coincidió con secuencias de EUA y México, mientras que el haplotipo G no coincidió con secuencias de otros países. Estos estudios contribuyeron a conocer el origen de *Ae. aegypti*, entendiendo el medio de transporte que utilizó para ingresar al país, y ayudaron a evaluar las implicaciones para la salud pública y guiar los esfuerzos para su control (Gloria-Soria et al., 2018). El presente trabajo tiene como objetivo determinar la variabilidad genética de poblaciones de larvas *Ae. aegypti* en diferentes localidades de Costa Rica para aportar nuevo conocimiento que ayude a entender la estructura genética poblacional de este mosquito.

2. Materiales y métodos

2.1 Diseño del estudio y sitios de muestreo

Se realizó un estudio de tipo transversal y descriptivo. Las giras se realizaron en conjunto con el Ministerio de Salud (MINSAL) en el período de agosto a noviembre del 2021 (4 meses en época lluviosa) a 26 localidades de 19 distritos localizados a menos de 900 metros sobre el nivel del mar, en los que históricamente se habían presentado casos de DENV, CHIKV y ZIKV (Buenos Aires, Concepción, San Isidro de El General, Playa Azul, Jacó, Tucurrique, Tárcoles, San Martín, Afriquita, La Suiza, Eslabón, Barrio El Naranjal 1, Barrio El Naranjal 2, La Chilería, El Cairo, San Rafael, La Selva, La Angelina, El Diamante, Las Palmas, La Rita y Pital) y en los que se reportaron brotes de arbovirus en el momento de la recolecta de muestras (Barrio La Margot, Punta Morales, La Carmen Lira y La Mora).

2.2. Recolecta de muestras

La recolecta de las larvas se llevó a cabo en calles, aceras y playas (seleccionadas al azar), en contenedores con agua estancada y sucia y que tuviera poca luz como charcos, botellas de refresco, hojas de plantas, cocos, latas, basura, partes de carro, llantas, estañones y chatarra. Las larvas recolectadas se colocaron vivas en recipientes de plástico con agua de su hábitat y se transportaron al laboratorio, en donde se realizó inmediatamente la identificación morfológica.

2.3. Análisis morfológico

Se identificaron todas las larvas encontradas en los recipientes y se separó únicamente las de *Ae. aegypti* utilizando las claves taxonómicas descritas por Rueda (2004). Una vez identificadas se agruparon por localidad, y se extrajo 1 larva por localidad la cual se almacenó a -80 °C hasta el análisis molecular.

2.4 Análisis molecular

Una larva de *Ae. aegypti* por localidad se sometió a extracción de ADN utilizando el ensayo Dneasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN), siguiendo las recomendaciones del fabricante. Se midió la calidad y cantidad del ácido nucleico extraído mediante NanoDrop. Seguidamente se sometió a análisis mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR), siguiendo el protocolo descrito por Escobar et al. (2022), con el fin de amplificar una región de 710pb del gen de la citocromo oxidasa I (COI). Los iniciadores utilizados fueron: LCO1490 (5'-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3') y HCO2198 (5'-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAATCA-3'). Las reacciones se realizaron en un volumen final de 50 µL, se agregó 25 µL Taq Master Mix 2x (Thermo Fisher Scientific), 2 µL de cada iniciador (10 nM), 17 µL de agua libre de nucleasa y 4 µL de ADN. Las condiciones de ciclado fueron: un ciclo inicial a 95°C durante 10 minutos, 37 ciclos a 94°C durante 1 minuto, 48°C durante 1 minuto, 72°C durante 1 minuto y un ciclo final a 72°C durante 7 minutos. Los amplicones se sometieron a electroforesis en gel de agarosa al 1% y se visualizaron en un transiluminador.

Los productos amplificados del PCR de punto final 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, el alineamiento múltiple se efectuó usando CLUSTALW y se compararon con las secuencias disponibles con la base de datos de GenBank, donde se verificó que correspondían a la especie *Ae. aegypti* con un porcentaje de similitud mayor al 98%, mediante la utilización del programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) de NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). Los sitios polimórficos se establecieron observando las posiciones variables en el lineamiento de las secuencias utilizando el programa DnaSP v.6.0. El análisis de aminoácidos su

traducción y comparación de secuencias de aminoácidos se llevó a cabo utilizando el programa BioEdit 7.2.5. Para la realización del árbol filogenético se utilizó el programa MEGA 10.1.8.

3. Resultados

Aedes aegypti se encontró en 20 de las 26 localidades y en los 19 distritos muestreados (Cuadro 1). Del total de 20 larvas analizadas se determinaron tres haplotipos. El haplotipo 1 (H1) fue el más abundante y el que presentó mayor distribución, encontrándose en 16 localidades, mientras que los haplotipos 2 (H2) y 3 (H3) se encontraron en una (La Mora) y tres localidades (La Carmen Lira, San Rafael y Pital), respectivamente (Cuadro 2, Figura 1). El árbol filogenético basado en la secuencia del gen COI I estableció 3 clados bien definidos, otorgándole un clado a cada haplotipo encontrado (Figura 2). El cantón de Turrialba fue el que presentó mayor variabilidad ya que se encontraron tres haplotipos en sus localidades. Al analizar las secuencias del gen COI de los 3 haplotipos se encontraron 15 sitios polimórficos (Cuadro 3). Los sitios polimórficos en la posición 55, 80 y 188 afectaron la secuencia de los aminoácidos. En la posición 55 el H1 codificó para una metionina (Met), mientras que en H2 y H3 para una isoleucina (Ile). En la posición 80 el H1 y H2 codificaron para una Met y H3 para una Ile y la posición 55 H1 y H2 para Ile y H3 para Met (Cuadro 4). La secuencia de aminoácidos se estableció con una longitud de 216 residuos y con cambios de aminoácidos en los tres haplotipos: metionina (Met) e isoleucina (Ile), mostrando una mutación con cambios de sentido (Cuadro 4).

Cuadro 1. Coordenadas geográficas de las localidades en que se encontraron larvas *Ae. aegypti* y tipo de haplotipo identificado.

Distrito	Localidad	Coordenadas		Haplotipo
		Longitud	Latitud	
Buenos Aires	Buenos Aires	-83.345364	9.162572	H1
Daniel Flores	Concepción	-83.657160	9.238357	H1
San Isidro de El General	San Isidro de El General	-83.708781	9.374551	H1
Chomes	Punta Morales	-84.945572	10.072762	H1
Tárcoles	Playa Azul	-84.633717	9.775853	H1
Jacó	Jacó	-84.6269457	9.6273826	H1
Turrialba	Barrio La Margot	-83.6868538	9.9103927	H1

La Isabel	La Mora	-83.676245	9.915485	H2
La Suiza	La Suiza	-83.609574	9.849404	H1
Pavones	Eslabón	-83.641261	9.880263	H1
Turrialba	La Carmen Lira	-83.676715	9.913490	H3
Puerto Viejo	Barrio El Naranjal 1	-83.998443	10.454111	H1
La Virgen	La Chilera	-84.103020	10.448361	H1
El Cairo	Cairo	-83.532904	10.119598	H1
Siquirres	San Rafael	-83.5082671	10.1047255	H3
Guácimo	La Selva	-83.710921	10.206178	H1
Guácimo	La Angelina	-83.738648	10.205522	H1
Guápiles	El Diamante	-83.774632	10.211391	H1
Rita	La Rita	-83.776214	10.265982	H1
Pital	Pital	-84.275609	10.449463	H3

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

Localidad, Distrito	Haplotipo (H)	Referencia GenBank	País	Identidad nucleótido	Porcentaje de identidad (%)
Buenos Aires, Buenos Aires Concepción, Concepción San Isidro de El General, San Isidro de El General Punta Morales, Chomes Playa Azul, Tárcoles Jacó, Jacó Barrio La Margot, Turrialba	H1	ON100811	Honduras *(A)	494/494	100%
La Suiza, La Isabel Eslabón, Pavones Barrio El Naranjal 1, Puerto Viejo La Chilera, La Virgen Cairo, El Cairo La Selva, Guácimo La Angelina, Guácimo El Diamante, Guápiles La Rita, Rita		MK028227- MK028228 MK028230- MK028232 MK028240- MK028242 MK028256 MK028258- MK028260	El Salvador *(A)	483/483	100%
La Mora, La Isabel	H2	KX171389- KX171390	Panamá *(L y A)	471/471	100%
La Carmen Lira, Turrialba San Rafael, Siquirres Pital, Pital	H3	MF443395- MF443397 MF043259	Canadá *(L y A)	650/650	100%

		KY022526	Alemania *(A)		
		MN733746- MN733753 MN733743, MN733745	Nueva Caledonia *(A)		
		ON100786- ON100795 ON100797- ON100810 ON100812- ON100813 ON100815- ON100816	Honduras *(A)	494/494	100%
		MK028219- MK028220 MK028222- MK028226 MK028229, MK028231 MK028235- MK028239 MK028244- MK028245 MK028248, MK028250 MK028254, MK028261	El Salvador *(A)	483/483	100%
		MG241352	Costa Rica*(A)	575/575	100%
		KX171394	Panamá *(L y A)	471/471	100%

*Haplotipo determinado a partir de larva (L) e insecto adulto (A).

Cuadro 3. Sitios polimórficos de los tres haplotipos del gen COI en las secuencias de *Ae. aegypti* encontrados en Costa Rica.

		Posiciones de sitios polimórficos													
Haplotipos	33	168	234	237	246	318	330	351	435	480	501	579	618	630	636
H1	T	G	T	C	G	A	A	T	G	G	C	A	T	G	C
H2	T	A	T	C	G	A	G	C	A	A	C	A	C	G	C
H3	C	A	C	T	A	G	G	C	G	A	T	G	T	A	T

Cuadro 4. Sitios de cambios de aminoácidos de los tres haplotipos (H1, H2 y H3) de larvas *Ae. aegypti* de Costa Rica, encontrados en las secuencias del gen COI.

Haplotipos	Posiciones		
	55	80	188
H1	Met	Met	Ile
H2	Ile	Met	Ile
H3	Ile	Ile	Met

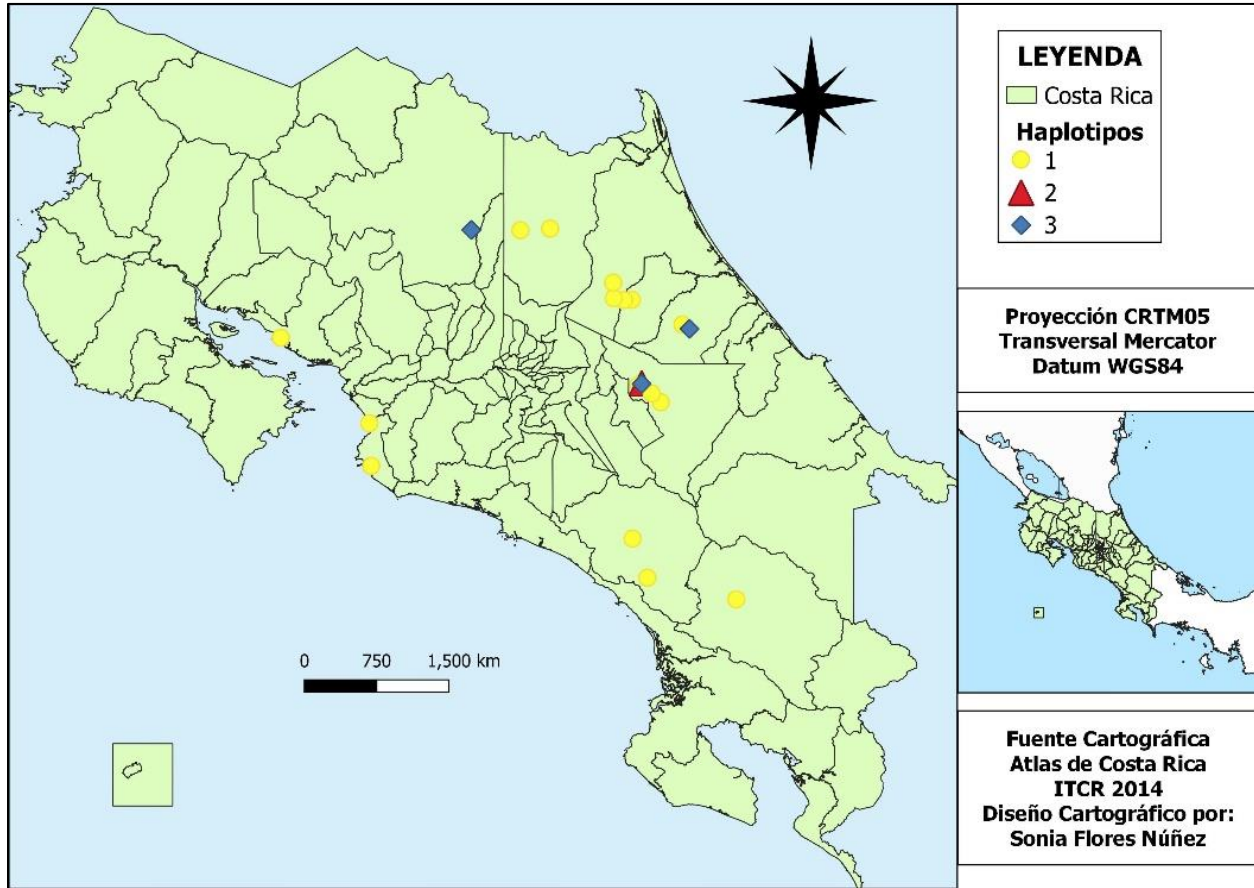


Figura 1. Mapa de distribución de haplotipos de *Ae. aegypti* encontrados en las diferentes localidades en Costa Rica, agosto a noviembre 2021. Haplotipo 3: reportado previamente en el año 2018 en Siquirres.

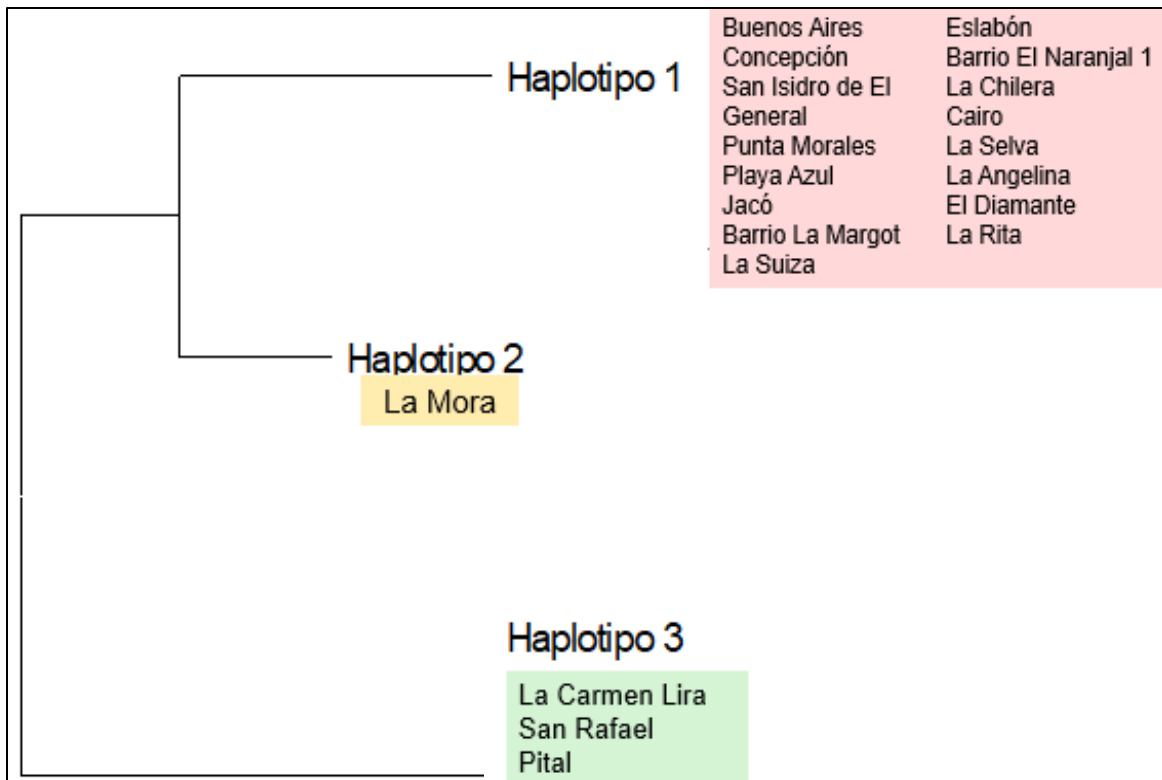


Figura 2. Árbol filogenético de los haplotipos de *Ae. aegypti* encontrados en 20 localidades de Costa Rica, agosto a noviembre 2021, basados en la secuencia del gen COI y generado mediante el uso de MEGA 10.1.8.

4. Discusión

Este es el segundo análisis genético, que busca establecer la presencia de haplotipos en larvas de *Ae. aegypti* en Costa Rica. Los resultados de este estudio encontraron baja diversidad genética (tres haplotipos en 20 localidades de 19 distritos), comparado con otros países como El Salvador donde analizaron 84 muestras de 6 departamentos y se encontraron 10 haplotipos (Joyce et al., 2018), Panamá donde se analizaron 122 muestras de 30 localidades y se encontraron 13 haplotipos (Eskildsen et al., 2018), Colombia donde se analizaron 255 muestras de 4 departamentos y se encontraron 33 haplotipos (Cadavid et al., 2015), y Brasil, donde se analizaron 163 muestras de 14 localidades y se encontraron 10 haplotipos (Scarpassa et al., 2008), y un segundo estudio de Colombia que analizó 145 muestras de 6 localidades y encontró 87 haplotipos (Gómez et al., 2022). Una posible causa de la baja cantidad de haplotipos detectados en

una región puede ser el uso indiscriminado de insecticidas, lo cual se ha reportado en varios países (Ecuador, México, Venezuela y Brasil) (Ponce et al., 2021). Sin embargo, es posible que los resultados obtenidos en la presente investigación se debieran al diseño del estudio utilizado, que solamente contempló investigar una larva por localidad, por limitantes de dinero. Esto puede haber influido en obtener una baja cantidad de haplotipos, por lo que se recomienda realizar estudios más sistemáticos y representativos en las diferentes localidades para confirmar los resultados obtenidos aquí.

El haplotipo 1 fue el más ampliamente distribuido, ya que se encontró en 16 localidades (Buenos Aires, Concepción, San Isidro de El General, Punta Morales, Playa Azul, Jacó, Barrio La Margot, La Suiza, Eslabón, Barrio El Naranjal, La Chilera, Cairo, La Selva, La Angelina, El Diamante y La Rita), son regiones que poseen clima (tropical húmedo con estación seca y lluviosa) y temperaturas (entre 20 a 26°C) similares (Barrientos & Chávez, 2008). Este haplotipo también ha sido reportado en El Salvador, donde también se reportó como el más ampliamente distribuido en todos sus departamentos (Joyce et al., 2018) mientras que, en Honduras, fue el haplotipo de menor distribución (Escobar et al., 2022). El Haplotipo 2 se encontró únicamente en la localidad de La Mora (cantón Turrialba) y es idéntico a secuencias reportadas en Panamá (Eskildsen et al., 2018). Finalmente, el Haplotipo 3 se encontró en tres localidades, San Rafael (cantón Siquirres); Pital (cantón San Carlos) y La Carmen Lira (cantón Turrialba), y ya había sido reportado con anterioridad en Siquirres (Gloria-Soria et al., 2018). En contraste con los Haplotipos 1 y 2 que solo se han reportado a la fecha en Centroamérica, este haplotipo ha sido encontrado también en países como Canadá, Nueva Caledonia y Alemania, además de Centroamérica, lo que hace pensar que los huevos de este haplotipo han encontrado la manera de sobrevivir las bajas temperaturas y la desecación (Giordano et al., 2022) o las etapas inmaduras han logrado establecerse en áreas no endémicas a través de actividades comerciales (Kamper et al., 2016; Joyce et al., 2018; Rakotonirina et al., 2020; Escobar et al., 2022; Gloria-Soria et al., 2018 y Eskildsen et al., 2018).

5. Conclusiones

- Se determinó la presencia tres haplotipos en larvas del mosquito *Ae. aegypti*.
- El haplotipo 1 fue el que se encontró más ampliamente distribuido, en 16 de las 20 localidades analizadas.
- El cantón de Turrialba fue el que presentó mayor variabilidad ya que se encontraron tres haplotipos en sus localidades.
- Al analizar las secuencias del gen COI de los tres haplotipos se encontraron 15 sitios polimórficos, los sitios polimórficos en la posición 55, 80 y 188 afectaron la secuencia de los aminoácidos.

6. Recomendaciones

- Realizar estudios sistemáticos para determinar si las localidades y el país muestran alta o baja diversidad genética de *Ae. aegypti*.
- Realizar un estudio genético comparativo entre temporada seca y lluviosa para determinar si la variabilidad genética se ve afectada por el clima.
- Confirmar si el haplotipo 1 es el más ampliamente distribuido en el país.

7. Referencias Bibliográficas

Arredondo-García, J. L., Méndez-Herrera, A., & Medina-Cortina, H. (2016). Arbovirus en latinoamérica. Acta pediátrica de México, 37(2), 111-131. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0186-23912016000200111#B6

Barrientos, O., & Chaves, G. (2008). Región Huetar Norte: oferta exportada actual y oferta potencial de productos agropecuarios alternativos (No. E71/10543). Promotora del Comercio Exterior de Costa Rica, San José, (Costa Rica). <http://www.mag.go.cr/bibliotecavirtual/E71-10543.pdf>

Bennett, K. L., Shija, F., Linton, Y. M., Misinzo, G., Kaddumukasa, M., Djouaka, R., Anyaele, O., Harris, A., Irish, S., Lutwama, J., Walton, C. (2016). Historical environmental change in Africa drives divergence and admixture of *Aedes aegypti* mosquitoes: a

precursor to successful worldwide colonization?. *Molecular ecology*, 25(17), 4337-4354.
<https://doi.org/10.1111/mec.13762>

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. <http://doi.org/10.7705/biomedica.v35i1.2343>

Cevallos, V., Benítez, D., Coloma, J., Carrazco, A., Wang, C., Holecheck, S., Quiroga, C., Castillo, G., Tillis, B., Ponce, P. (2019). Genetic variation of *Aedes aegypti* populations from Ecuador. *bioRxiv*. <https://doi.org/10.1101/2019.12.17.875591>

Corrales-Aguilar, E., Troyo, A., & Calderón-Arguedas, Ó. (2015). Chikungunya: un virus que nos acecha. *Acta Médica Costarricense*, 57(1), 07-15.
<https://www.scielo.sa.cr/pdf/amc/v57n1/art02v57n1.pdf>

Corrales Aguilar, E., & Soto Garita, C. (2016). El virus del Zika.
<https://www.kerwa.ucr.ac.cr/handle/10669/30370?locale-attribute=en>

Costa-da-Silva, A. L. D., Capurro, M. L., & Bracco, J. E. (2005). Genetic lineages in the yellow fever mosquito *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Diptera: Culicidae) from Peru. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 100, 539-544. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762005000600007>

Escobar, D., Ortiz, B., Urrutia, O., & Fontecha, G. (2022). Genetic Diversity among Four Populations of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) from Honduras as Revealed by Mitochondrial DNA Cytochrome Oxidase I. *Pathogens*, 11(6), 620.
<https://doi.org/10.3390/pathogens11060620>

Eskildsen, G. A., Rovira, J. R., Smith, O., Miller, M. J., Bennett, K. L., McMillan, W. O., & Loaiza, J. (2018). Maternal invasion history of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* into

the Isthmus of Panama: Implications for the control of emergent viral disease agents. PLoS One, 13(3), e0194874. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0194874>

Gandhi, R., Yadav, K. K., Patil, P. B., Bihani, P., Char, B., Dasgupta, S. K., Zehr, U., Barwale, S. R. (2020). Molecular analysis of mitochondrial cytochrome oxidase I gene of *Aedes aegypti* L. mosquitoes. Journal of Asia-Pacific Entomology, 23(1), 51-59. <https://doi.org/10.1016/j.aspen.2019.10.006>

Giordano, B. V., Gasparotto, A., Liang, P., Nelder, M. P., Russell, C., & Hunter, F. F. (2020). Discovery of an *Aedes* (*Stegomyia*) *albopictus* population and first records of *Aedes* (*Stegomyia*) *aegypti* in Canada. Medical and veterinary entomology, 34(1), 10-16. <https://doi.org/10.1111/mve.12408>

Gloria-Soria, A., Lima, A., Lovin, D. D., Cunningham, J. M., Severson, D. W., & Powell, J. R. (2018). Origin of a high-latitude population of *Aedes aegypti* in Washington, DC. The American journal of tropical medicine and hygiene, 98(2), 445. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.17-0676>

Gómez, M., Martínez, D., Hernández, C., Luna, N., Patiño, L. H., Melo, R. B., Suarez, L., Palma-Cuero, M., Murcia, L., González, L., Estrada, L., Medina, M., Ariza, K., Padilla, H., Zamora, A., De Las Salas, J., Muñoz, M., Ramírez, J. D. (2022). Arbovirus infection in *Aedes aegypti* from different departments of Colombia. Frontiers in Ecology and Evolution, 10. <https://doi.org/10.3389/fevo.2022.999169>

Huber, K., Ba, Y., Dia, I., Mathiot, C., Sall, A. A., & Diallo, M. (2008). *Aedes aegypti* in Senegal: genetic diversity and genetic structure of domestic and sylvatic populations. The American journal of tropical medicine and hygiene, 79(2), 218-229. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2008.79.218>

Joyce, A. L., Torres, M. M., Torres, R., & Moreno, M. (2018). Genetic variability of the *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) mosquito in El Salvador, vector of dengue, yellow fever, chikungunya and Zika. *Parasites & vectors*, 11(1), 1-14.

<https://doi.org/10.1186/s13071-018-3226-5>

Kampen, H., Jansen, S., Schmidt-Chanasit, J., & Walther, D. (2016). Indoor development of *Aedes aegypti* in Germany, 2016. *Eurosurveillance*, 21(47), 30407.

<https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2016.21.47.30407>

Morice, A., Marín, R., & Avila, M. (2010). El dengue en Costa Rica: evolución histórica, situación actual y desafíos. *La Salud Pública en Costa Rica. Estado actual, retos y perspectivas*. San José, 197-217.

<https://www.binasss.sa.cr/opac-ms/media/digitales/El%20dengue%20en%20Costa%20Rica.%20Evoluci%C3%B3n%20hist%C3%B3rica,%20situaci%C3%B3n%20actual%20y%20desaf%C3%ADos.pdf>

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.

<https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2020.01.021>

Pérez, F., Llau, A., Gutierrez, G., Bezerra, H., Coelho, G., Ault, S., Brandao, S., Carballo, M., Cerezo, L., Kleber, G., Pacheco, O., Perez, O., Picos, V., Rojas, D., Bosco, J., Fidel, M., Harris, E., Castellanos, L., Espinal, C., & Martin, J. (2019). The decline of dengue in the Americas in 2017: discussion of multiple hypotheses. *Tropical medicine & international health : TM & IH*, 24(4), 442–453. <https://doi.org/10.1111/tmi.13200>

Ponce, P., Muñoz-Tobar, S., Carrasco-Montalvo, A., Villota, S. D., Coloma, J., Wang, C., Holechek, S., Cevallos, V. (2021). Two Haplotypes of *Aedes aegypti* Detected by ND4 Mitochondrial Marker in Three Regions of Ecuador. *Insects*, 12(3), 200.

<https://doi.org/10.3390/insects12030200>

Rakotonirina, A., Pol, M., Kainiu, M., Barsac, E., Tutagata, J., Kilama, S. O'Connor, O., Tarantola, A., Colot, J., Dupont-Rouzeyrol, M., Richard, V., & Pocquet, N. (2020). MALDI-TOF MS: optimization for future uses in entomological surveillance and identification of mosquitoes from New Caledonia. *Parasites & vectors*, 13(1), 1-12.

<https://doi.org/10.1186/s13071-020-04234-8>

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. <http://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000527>

Salgueiro, P., Serrano, C., Gomes, B., Alves, J., Sousa, C. A., Abecasis, A., & Pinto, J. (2019). Phylogeography and invasion history of *Aedes aegypti*, the Dengue and Zika mosquito vector in Cape Verde islands (West Africa). *Evolutionary applications*, 12(9), 1797-1811. <https://doi.org/10.1111/eva.12834>

Scarpassa, V. M., Cardoza, T. B., & Cardoso, R. P. (2008). Population genetics and phylogeography of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) from Brazil. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 78(6), 895-903. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2008.78.895>

Sousa, A. A. D., Fraga, E., Sampaio, I., Schneider, H., & Barros, M. C. (2017). Genetic differentiation in populations of *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae) dengue vector from the Brazilian state of Maranhão. *Revista Brasileira de Entomologia*, 61, 51-59. <https://doi.org/10.1016/j.rbe.2016.10.003>

Tapia-López, E., Bardach, A., Ciapponi, A., Alcaraz, A., García-Perdomo, H. A., Ruvinsky, S., & Belizán, M. (2019). Experiencias, barreras y facilitadores en la implementación de intervenciones de control del *Aedes aegypti* en América Latina y Caribe: estudio cualitativo. *Cadernos de Saúde Pública*, 35, e00092618. <https://doi.org/10.1590/0102-311X00092618>

Urdaneta-Marquez, L., & Failloux, A. B. (2011). Population genetic structure of *Aedes aegypti*, the principal vector of dengue viruses. *Infection, Genetics and Evolution*, 11(2), 253-261. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2010.11.020>

Valencia, M. D. (2018). Análisis de heteromorfismos genéticos de *Aedes aegypti* en dos zonas endémicas de dengue en Colombia. <https://ciencia.lasalle.edu.co/biologia/44/>

Wang, G. (2022). *Aedes aegypti* mtDNA COX1 [Manuscrito no publicado]. Institute for Microbial Epidemiology, Academy of Military Medical Sciences. [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/OM865376.1?report=genbank&log\\$=nuclalign&blast_rank=15&RID=96ZCNT5P016](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/OM865376.1?report=genbank&log$=nuclalign&blast_rank=15&RID=96ZCNT5P016)

DISCUSIÓN GENERAL

Conocer la biodiversidad de mosquitos presentes en un ecosistema o localidades, es importante, para establecer la dispersión de especies autóctonas y detectar especies invasivas fuera de los rangos geográficos originales. Además, estos estudios entomológicos periódicos permiten actualizar la información sobre la diversidad, la riqueza de especies y la abundancia de mosquitos hematófagos, sobre todo en áreas, que están sufriendo cambios debido al calentamiento global o al urbanismo, con el propósito de poder medir el riesgo para prevenir enfermedades transmitidas por mosquitos, que fue el objetivo del presente trabajo (Casas-Martínez et al., 2012). La especie de larva de mosquito mayormente recolectada en la presente investigación fue *Ae. aegypti*. La predominancia de esta especie sobre las otras se debe a que tiene un comportamiento sinantrópico, esta especie se adapta fácilmente a múltiples criaderos y a cambios climáticos (diapausa), lo que favorece el establecimiento de focos endémicos (Kweka et al., 2018). La dominancia de esta especie ya se había reportado en estudios previos en Costa Rica (Calderón-Arguedas et al., 2004; Marín et al., 2009). Además, se ha observado que esta especie puede convivir con otros mosquitos, compartir el mismo hábitat y recursos, lo cual podría deberse a un solapamiento de nicho sin descartarse la posibilidad de competencia interespecífica (Marquetti, 2006). Los distritos de Guácimo y La Virgen fueron las comunidades donde se encontró la mayor riqueza de especies (6) y los resultados similares entre los dos distritos podría deberse a las características similares que poseen ambos distritos por la corta distancia (72 km) que hay entre ellas, una temperatura que oscila entre 27°- 30°C, un clima tropical húmedo con abundantes lluvias y precipitación pluvial de hasta 300 mm mensual (Barrientos & Chaves, 2008; MEP., s.f.).

La mayoría de los distritos analizados mostraron poca riqueza y diversidad de especies (menos de seis especies), y tres distritos (Jacó, La Suiza y Pital) presentaron solamente una especie (*Ae. aegypti*). Esto podría deberse a que los sitios visitados son de ecosistemas deforestados y desérticos (más urbanizados) dando lugar a comunidades dominadas por mosquitos adaptados a entornos urbanos, causando que especies locales sean desplazadas y aumentando así el riesgo de propagación de arbovirus. La

escasez de recursos y hábitats podría favorecer que algunos mosquitos con adaptabilidad a estos entornos podrían ser los únicos en desarrollarse y convertirse en adultos (Lee et al., 2019). El diseño de estudio de la toma de muestra fue al azar y no sistemático, lo que también pudo afectar el registro de especies por falta de esfuerzo de muestreo, influyendo en la cantidad de especies identificadas (Dousdebes, 2017). De todos los distritos visitados, Pavones presentó el índice de Pielou más alto (0.84), esto significa que sus especies se encuentran distribuidas con mayor equidad, lo contrario sucede en los distritos de Tucurrique (0.30) y Siquirres (0.32). Esto demuestra que la distribución de la diversidad de un ecosistema o una comunidad puede verse afectado por factores como la actividad antropogénica (mayor urbanización), cambios ambientales (deforestación) y climáticos, lo que ocasiona que algunas especies de mosquitos proliferen y estén en mayor abundancia mientras que otras en menor cantidad (Almeida et al., 2020). Se recomienda realizar vigilancia entomológica, no solo para el mosquito *Aedes* spp., sino también para otras especies hematófagas, que son de importancia médica, debido a que también pueden transmitir enfermedades, como es el caso del mosquito *Culex* spp. En este estudio se identificaron 5 especies (*C. coronator*, *C. corniger*, *C. quinquefasciatus*, *C. nigripalpus* y *C. interrogator*) y este mosquito se ha implicado como el vector biológico de la filariasis (*Wuchereria bancrofti*), de la que se han reportado casos en Costa Rica en 1954 en Puerto Limón (Calderón-Arguedas et al., 2009; Lieske, 1954). Además, este vector consume sangre, tanto de animales como de humanos por lo tanto se ha asociado como vector mecánico del virus de oeste del Nilo, virus de la encefalitis de Saint Louis y virus de la encefalitis equina del este (Calderón-Arguedas et al., 2009). Estos virus son endémicos en Costa Rica y se han reportado casos en caballos, animales domésticos y salvajes (Romero-Vega et al., 2022).

El no haber logrado detectar arbovirus en los 74 grupos de larvas, podría deberse, por un lado a que solamente se analizaron un 17% (13 grupos) de larvas de zonas con brotes y los restantes grupos fueron de localidades en las que en el pasado se habían reportado brotes. Por el otro lado, se ha reportado, que las tasas de transmisión transovárica ocurren en niveles bajos en la naturaleza (da Costa et al., 2017; Lequime & Lambrechts, 2014). En estudios realizados a nivel experimental, se determinó que la tasa de

transmisión transovárica debía ser de un 5-26% para que los arbovirus persistieran en las siguientes generaciones, pero en una infección natural se cree que esto no sea mayor (Zeidler et al., 2008) por lo tanto, si se recogen muestras en el campo solo un porcentaje pequeño (1-4%) de los individuos analizados posiblemente se encuentren infectados por arbovirus (Adams & Boots, 2010). Por otro lado, no toda población de mosquitos adultos se infecta de forma horizontal (de un huésped virémico), incluso durante una epidemia, ya que en la naturaleza menos del 20% de mosquitos hembra se infectarán (Joshi et al., 2002). El número de infecciones en la población de larvas parece ser muy pequeño, además la población de larvas infectadas verticalmente se reducirá considerablemente con cada generación sucesiva (Adams & Boots, 2010). Se cree que la transmisión transovárica ocurre a un ritmo muy bajo, y que la reintroducción de arbovirus a regiones libres se deba más bien por el ingreso de personas infectadas a un área. La transmisión vertical parece contribuir a la persistencia de arbovirus en una comunidad en un plano secundario a la transmisión horizontal (Zeidler et al., 2008).

Este es el segundo análisis genético, que busca establecer la presencia de haplotipos en larvas de *Ae. aegypti* en Costa Rica. Los resultados de este estudio encontraron baja diversidad genética (tres haplotipos en 20 localidades de 19 distritos), comparado con otros países como El Salvador donde analizaron 84 muestras de 6 departamentos y se encontraron 10 haplotipos (Joyce et al., 2018), Panamá donde se analizaron 122 muestras de 30 localidades y se encontraron 13 haplotipos (Eskildsen et al., 2018), Colombia donde se analizaron 255 muestras de 4 departamentos y se encontraron 33 haplotipos (Cadavid et al., 2015), y Brasil, donde se analizaron 163 muestras de 14 localidades y se encontraron 10 haplotipos (Scarpassa et al., 2008), y un segundo estudio de Colombia que analizó 145 muestras de 6 localidades y encontró 87 haplotipos (Gómez et al., 2022). Una posible causa de la baja cantidad de haplotipos detectados en una región puede ser el uso indiscriminado de insecticidas, lo cual se ha reportado en varios países (Ecuador, México, Venezuela y Brasil) (Ponce et al., 2021). Sin embargo, es posible que los resultados obtenidos en la presente investigación se debieran al diseño del estudio utilizado, que solamente contempló investigar una larva por localidad, por limitantes de dinero. Esto puede haber influido en obtener una baja cantidad de

haplotipos, por lo que se recomienda realizar estudios más sistemáticos y representativos en las diferentes localidades para confirmar los resultados obtenidos aquí.

El haplotipo 1 fue el más ampliamente distribuido, ya que se encontró en 16 localidades (Buenos Aires, Concepción, San Isidro de El General, Punta Morales, Playa Azul, Jacó, Barrio La Margot, La Suiza, Eslabón, Barrio El Naranjal, La Chilera, Cairo, La Selva, La Angelina, El Diamante y La Rita), son regiones que poseen clima (tropical húmedo con estación seca y lluviosa) y temperaturas (entre 20 a 26°C) similares (Barrientos & Chávez, 2008). Este haplotipo también ha sido reportado en El Salvador, donde también se reportó como el más ampliamente distribuido en todos sus departamentos (Joyce et al., 2018) mientras que, en Honduras, fue el haplotipo de menor distribución (Escobar et al., 2022). El Haplotipo 2 se encontró únicamente en la localidad de La Mora (cantón Turrialba) y es idéntico a secuencias reportadas en Panamá (Eskildsen et al, 2018). Finalmente, el Haplotipo 3 se encontró en tres localidades, San Rafael (cantón Siquirres); Pital (cantón San Carlos) y La Carmen Lira (cantón Turrialba), y ya había sido reportado con anterioridad en Siquirres (Gloria-Soria et al., 2018). En contraste con los Haplotipos 1 y 2 que solo se han reportado a la fecha en Centroamérica, este haplotipo ha sido encontrado también en países como Canadá, Nueva Caledonia y Alemania, además de Centroamérica, lo que hace pensar que los huevos de este haplotipo han encontrado la manera de sobrevivir las bajas temperaturas y la desecación (Giordano et al., 2022) o las etapas inmaduras han logrado establecerse en áreas no endémicas a través de actividades comerciales (Kamper et al., 2016; Joyce et al., 2018; Rakotonirina et al., 2020; Escobar et al., 2022; Gloria-Soria et al., 2018 y Eskildsen et al, 2018).

CONCLUSIONES GENERALES

- La especie de mosquito *Ae. aegypti* fue la especie que se encontró en forma predominante en los 19 distritos analizados.
- Los distritos que mostraron mayor riqueza y diversidad de mosquitos fueron Guácimo y La Virgen con seis de ocho especies identificadas (*Ae. aegypti*, *Ae. albopictus*, *Culex coronator*, *Culex corniger*, *Culex quinquefasciatus*, *Culex nigripalpus*, *Culex interrogator* y solo género *Limatus*), mientras que en Jacó, La Suiza y Pital solamente se detectó una especie (*Ae. aegypti*).
- El distrito de Pavones presentó mayor equitatividad en la distribución de las especies.
- Se encontraron especies de mosquitos que son potenciales de vectores de enfermedades que podrían representar riesgos para la salud humana y animal.
- No se logró detectar la presencia de los virus del DENV, CHIKV y ZIKV en larvas *Ae. aegypti*.
- Se determinó la presencia tres haplotipos en larvas del mosquito *Ae. aegypti*.
- El haplotipo 1 fue el que se encontró más ampliamente distribuido, en 16 de las 20 localidades analizadas.
- El cantón de Turrialba fue el que presentó mayor variabilidad ya que se encontraron tres haplotipos en sus localidades.
- Al analizar las secuencias del gen COI de los tres haplotipos se encontraron 15 sitios polimórficos, los sitios polimórficos en la posición 55, 80 y 188 afectaron la secuencia de los aminoácidos.

RECOMENDACIONES GENERALES

- Realizar muestreos sistemáticos y periódicos para monitorear la presencia, densidad y comportamiento de los vectores en localidades representativas con brote y endémicas.
- Mantener la vigilancia de otras especies hematófagas para prevenir otras patologías que podrían estar afectando a humanos y animales.
- Realizar estudios sistemáticos para determinar si las localidades y el país muestran alta o baja diversidad genética de *Ae. aegypti*.

- Realizar un estudio genético comparativo entre temporada seca y lluviosa para determinar si la variabilidad genética se ve afectada por el clima.
- Confirmar si el haplotipo 1 es el más ampliamente distribuido en el país.