

Papel potencial de *Aedes albopictus* Skuse en la transmisión de virus dengue (DENV) en una zona de actividad piñera de Costa Rica

Ólger Calderón-Arguedas¹, Rolando D. Moreira-Soto¹, Amanda Vicente-Santos², Eugenia Corrales-Aguilar², Diana Rojas-Araya¹, Adriana Troyo¹

¹ Centro de Investigación en Enfermedades Tropicales (CIET). Laboratorio de Investigación en Vectores (LIVE), Sección de Entomología Médica, Departamento de Parasitología, Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica. ² Sección de Virología, Departamento de Microbiología e Inmunología, Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica

ABSTRACT

Objective. To evaluate, under an ecological perspective, the presence of *Aedes albopictus* and the wild infection by dengue viruses (DENV) in an area of pineapple activity in Costa Rica.

Materials and methods. Adult mosquitoes were collected in forest galleries limiting pineapple plantations, houses adjacent to plantations (<1 km), and distant houses (1-10 km). Shannon-Wiener index was used to estimate biodiversity. Larval infestation was evaluated in pineapple plants and houses, and aedic house (HI) and container (CI) indices were calculated. Detection of DENV in *Ae. albopictus* adults (bodies and heads) and larvae was performed by RT-PCR and sequencing.

Results. A total 1376 adult mosquitoes were collected: *Ae. albopictus* (5.81%), *Anopheles apicimacula* (5.01%), *Culex coronator* (11.55%), *Cx. inflicus* (6.1%), *Cx. nigripalpus* (48.11%), *Cx. quinquefasciatus* (23.34%), and *Limatus durhamii* (0.07%). Biodiversity index was higher in forest galleries. Most adult *Ae. albopictus* were collected in forests close to pineapple fields (73/80), although only 2 larvae were detected in pineapple plants. Larval indices in adjacent houses (HI: 40.7%, CI: 26.9%) and distant houses (HI: 51.7%, CI: 29.6%) were similar (HI $Z=0.56$, $p=0.58$; CI $Z=0.16$, $p=0.87$). DENV-2 and DENV-3 were detected in 2/20 “pools” of *Ae. albopictus* heads and DENV-1 in 2/74 “pools” of larvae.

Conclusion. Forest galleries that are in proximity to pineapple plantations could be considered “ecological islands” that are suitable for refuge of *Ae. albopictus*. Presence of DENV in adults and larvae suggests an active role for *Ae. albopictus* in virus transmission within this ecosystem.

Historial del artículo

Recibido: 17 ago 2018

Aceptado: 28 nov 2018

Disponible online: 1 may 2019

Palabras clave

Aedes, Culicidae, dengue, flavivirus, Costa Rica

Keywords

Aedes, Culicidae, dengue, Flavivirus, Costa Rica

Copyright © 2019 por autores y Revista Biomédica.

Este trabajo está licenciado bajo las atribuciones de la Creative Commons (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

Autor para correspondencia:

Ólger Calderón Arguedas, Laboratorio de Investigación en Vectores (LIVE), Centro de Investigación en Enfermedades Tropicales (CIET), Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica

correo electrónico: olger.calderon@ucr.ac.cr
<http://revistabiomedica.mx>

RESUMEN

Objetivo. Evaluar, bajo una perspectiva ecológica, la presencia de *Aedes albopictus* y su infección natural por virus dengue (DENV) en una zona de actividad piñera de Costa Rica.

Método. Se colectaron mosquitos adultos en galerías forestales colindantes con piñeras, viviendas en proximidad a cultivos (<1 km) y viviendas en lejanía (1-10 km). Se empleó el índice de Shannon-Wiener para estimar biodiversidad. La infestación larvaria se evaluó en plantas de piña y viviendas y se calcularon índices aélicos de viviendas (IV) y de contenedores (IC). La detección de DENV en adultos (cuerpos y cabezas) y en larvas de *Ae. albopictus* se efectuó mediante RT-PCR y secuenciación.

Resultados. Se colectaron 1376 adultos en total: *Ae. albopictus* (5,81%), *Anopheles apicimacula* (5,01%), *Culex coronator* (11,55%), *Cx. inflicus* (6,1%), *Cx. nigripalpus* (48,11%), *Cx. quinquefasciatus* (23,34%) y *Limatus durhamii* (0,07%). El índice de biodiversidad fue mayor en galerías forestales. *Ae. albopictus* adultos fueron colectados principalmente en el área de piñeras (73/80), aunque sólo dos larvas en las plantas de piña. Los índices aélicos en proximidad (IV: 40,7%, IC: 26,9%) y en lejanía (IV: 51,7%, IC: 29,6%) no mostraron diferencias significativas (IV $Z=0,56$, $p=0,58$; IC $Z=0,16$, $p=0,87$). Se detectó DENV-2 y DENV-3 en 2/20 grupos de cabezas y DENV-1 en 2/74 grupos de larvas de *Ae. albopictus*.

Discusión. Las galerías forestales próximas a cultivos de piña podrían considerarse “islas ecológicas” adecuadas para el refugio de *Ae. albopictus*. La presencia de DENV en adultos y larvas sugiere un papel activo de *Ae. albopictus* en la transmisión de virus en este ecosistema.

INTRODUCCIÓN

Aedes albopictus, conocido como el mosquito tigre, es una especie de culicido originaria del sudeste asiático (1). Su introducción al continente americano tuvo lugar en los años 80, década en la que se detectó su presencia en Estados Unidos y Brasil. Se cree que esta estuvo relacionada con la importación de plantas (*Dracaena* sp.) o llantas usadas procedentes del sudeste asiático (1,2). A partir de ese momento, *Ae. albopictus* ha mostrado una rápida expansión por todo el continente americano, incluyendo Costa Rica (3). Los primeros informes de *Ae. albopictus* en Costa Rica datan de

1998 y los mismos se refirieron a declaraciones periódicas de personeros del Ministerio de Salud, quienes evidenciaron su presencia en el distrito “La Virgen” en el Cantón de Sarapiquí (3). Actualmente *Ae. albopictus* ha sido reportado en seis de las siete provincias del país, con excepción de Cartago (3-6).

Desde un punto de vista de salud pública, *Ae. albopictus* ha sido vinculado con la transmisión de virus como dengue (DENV), chikungunya (CHIKV), encefalitis japonesa (JEV), San Angelo y La Crosse (7). Recientemente, se ha podido comprobar su capacidad y competencia vectorial en la transmisión del virus Zika (ZIKV) (8,9). Además, se ha demostrado su papel en la transmisión biológica del parásito *Dirofilaria immitis* (10). Específicamente en lo referente a transmisión de DENV, *Ae. albopictus* es considerado, junto con *Aedes aegypti*, un vector primario, ya que se han documentado epidemias en las cuales figura como la única especie de vector involucrada. Esto ha tenido lugar en la isla La Reunión en la epidemia de 1977-1978, en Hawaii en la epidemia de 2001 y 2002 y en las islas Mauricio en 2009 (11-13). Para esta especie, y a diferencia de *Ae. aegypti*, la transmisión transovárica de DENV parece ocurrir de forma relativamente común (2).

El cultivo extensivo de piña (*Ananas comosus*) inició en Costa Rica a finales de los años 80 (14). Hoy en día, se estima que existen más de 45 000 hectáreas de este cultivo, ubicadas principalmente en la región sur y la del Caribe del país (14). Este monocultivo ha sido vinculado con problemas ecológicos que comprometen la salud humana y animal. Dentro de estos deben destacarse la contaminación de cuencas hidrográficas con residuos de pesticidas y la proliferación de la mosca hematófaga *Stomoxys calcitrans* (14, 15). De igual forma, se ha denunciado la presencia de grandes cantidades de mosquitos que corresponden a *Ae. albopictus*, los cuales infringen picaduras a las personas que residen en las cercanías de piñeras orgánicas. En estas plantaciones se prescinde del uso de pesticidas. Ejemplares de *Ae. albopictus* colectados en estos ambientes han evidenciado su infección natural por DENV (16).

A pesar de que algunos estudios han podido documentar que las piñas, junto con otras plantas bromeliáceas y de banano, podrían servir como sitios naturales para la oviposición y el desarrollo larval de *Ae. albopictus* (17), la relación entre *Ae. albopictus* y las piñeras en Costa Rica parece ser un evento relativamente reciente, ya que la primera denuncia conocida por el Ministerio de Salud sobre el aumento en la densidad de este mosquito, asociado a estos agrosistemas, data del año 2012 (16). El propósito del presente estudio fue evaluar, bajo una perspectiva ecológica, la presencia de *Ae. albopictus* y la infección natural por virus dengue (DENV) en una zona de actividad piñera de Costa Rica.

MATERIAL Y MÉTODOS

El estudio se efectuó en una piñera ubicada 3 km al este del centro urbano del distrito La Virgen del cantón de Sarapiquí, provincia de Heredia (latitud: 10° 26' 01" N; longitud: 84° 07' 14" O, elevación: 187 m.s.n.m). Esta localidad reporta una temperatura media anual de 26°C (fluctúa entre los 21- 31°C), una precipitación media anual de 3710 mm y un promedio de 193 días con lluvia al año (18). En colindancia con la plantación, cuya extensión es de 400 hectáreas, se encuentran unas 50 viviendas en condición dispersa. Dentro de dicha plantación se ubica un río con sus afluentes, cuyos cauces se encuentran cubiertos por galerías forestales.

El trabajo de campo se efectuó en julio del 2014 que coincide con la estación lluviosa en la región. Los mosquitos adultos fueron capturados, mediante una única colecta, en trampas CDC suplementadas con CO₂ por un periodo de 16 a 24 horas. Tomando como referencia las áreas cultivadas, se colocaron tres trampas para cada uno de los siguientes sitios: 1) galerías forestales colindantes, 2) viviendas localizadas en proximidad (<1 km), y 3) viviendas localizadas en lejanía (1-10 km). Para su manipulación inicial, los mosquitos capturados se inactivaron en una cámara con éter etílico y fueron transportados vivos, en seco, hasta el Laboratorio de Investigación en Vectores (LIVE) del Centro de Investigación en Enfermedades Tropicales (CIET), Universidad de Costa Rica, donde se conservaron a 4°C hasta su

procesamiento. Los diferentes morfotipos adultos fueron separados, contabilizados y algunos de los ejemplares, representativos de cada grupo, fueron identificados a nivel de especie mediante el uso de claves dicotómicas (19, 20). Los adultos de *Ae. albopictus* fueron procesados para la detección de DENV. Se aplicó una prueba de Chi cuadrado para valorar la homogeneidad en las muestras en cuanto a constitución y abundancia de especies de acuerdo a los sitios muestreados (21). El análisis se realizó mediante el programa EPIDAT versión 3.1 (Xunta de Galicia/OPS). La expresión de biodiversidad en cada uno de los sitios de colecta se efectuó mediante el cálculo del índice de Shannon-Wiener (H') el cual se define de la siguiente manera:

$$H' = - \sum_{i=1}^s p_i \ln p_i$$

Donde s corresponde a la riqueza de especies y p_i a la proporción de individuos de la especie i respecto al total de individuos (es decir, la abundancia relativa de la especie i : n_i/N , donde n_i es el número de individuos por especie y N es el número total de individuos de todas las especies) (22).

La determinación de la infestación larvaria por *Ae. albopictus* en plantas de piña se efectuó en ocho conglomerados de aproximadamente 40 plantas por cada uno. Estos estuvieron separados por una distancia no menor a 50 m, uno del otro y se ubicaron en la periferia de los campos de cultivo en colindancia con las galerías forestales, donde se efectuó la colecta de adultos. Adicionalmente se identificaron los criaderos asociados con las viviendas ubicadas en proximidad y lejanía respecto a los cultivos de piña. Estas viviendas tuvieron las mismas características en términos de construcción, extensión del peridomicilio y cobertura forestal. A partir de cada criadero positivo y dependiendo de la cantidad, se tomó la totalidad de las larvas o una muestra representativa, la cual fue dispuesta en viales con agua para su transporte al laboratorio. Las larvas de *Ae. albopictus* fueron identificadas, separadas, contadas y procesadas para la detección de DENV, como se describe abajo. Algunas larvas de *Ae. albopictus* se montaron en medio Hoyer para su confirmación taxonómica mediante claves

dicotómicas especializadas (19,20). La infestación larvaria por *Ae. albopictus* se expresó mediante el cálculo los índices aélicos de viviendas (IV) y de contenedores (IC) (23). El análisis estadístico correspondiente se realizó por medio de pruebas Z para comparación de proporciones utilizando una significancia del 95% (α : 0,05) (21). Dichas pruebas fueron efectuadas mediante el programa EPIDAT versión 3.1.

Los adultos de *Ae. albopictus* fueron distribuidos según sitio de colecta en grupos de machos o de hembras de hasta 10 individuos. En el caso de las hembras, éstas fueron seccionadas para obtener grupos de cuerpos y de sus correspondientes cabezas. De manera similar, las larvas de *Ae. albopictus* de cada sitio de colecta se separaron por contenedor y se prepararon grupos de hasta 10 larvas. Todos los grupos de machos, cabezas, cuerpos y larvas se colocaron en solución RNAlater® y se mantuvieron a -70 °C hasta su procesamiento. Cada grupo fue macerado y se sometió a un proceso de extracción de ARN con el kit comercial NucleoSpin® Tissue kit (Macherey-Nagel, Alemania). Con el ARN obtenido se sintetizó ADNc utilizando el kit RevertAid™ H Minus (Fermentas®, ThermoFisher Scientific, USA) e imprimadores aleatorios (random primers), según las instrucciones del fabricante. Se realizó un PCR semianidado siguiendo el protocolo previamente descrito por Lanciotti y colaboradores (24). Brevemente, el PCR se realizó con ADNc y con los imprimadores D1 y D2, que amplifican un fragmento de 511 pb de los genes de la cápside y premembrana (C/prM). La segunda amplificación se realizó con una dilución del producto del primer PCR y los imprimadores D1 y TS1-TS2-TS3-TS4, los cuales generan productos de PCR de diferentes tamaños para cada serotipo (482 pb para DENV-1, 119 pb para DENV-2, 290 pb para DENV-3, y 392 pb para DENV-4). Se emplearon, como controles positivos para la confirmación de serotipos, las siguientes cepas de referencia: DENV-1 Angola [D1/AO/XX/1988], DENV-2 Jamaica [D2/JM/1409/1983], DENV-3 Nicaragua [D3/NI/30-94/1994], DENV-4 Dominica [D4/DM/814669/1981]; y se utilizó agua destilada como

control negativo. Adicionalmente, segmentos de ADNc entre 424 pb y 461 pb, que incluyen la región C/prM, fueron amplificados mediante otro protocolo de PCR semianidado descrito por de Thoisy y colaboradores (25). Nuevamente, se utilizó el producto del primer PCR de Lanciotti y colaboradores (24) junto con el imprimador D1 y uno de los imprimadores reversos serotipo-específico descritos por de Thoisy y colaboradores (25). Los productos de PCR fueron purificados con Exonucleasa I y “Thermo Scientific FastAP Thermosensitive Alkaline Phosphatase” (Thermo Fisher Scientific Inc.), siguiendo las instrucciones del fabricante. Ambas hebras de los fragmentos amplificados fueron secuenciadas en Macrogen Inc. (Seúl, Corea del Sur), mediante el uso de los imprimadores de Thoisy y colaboradores (25).

Las secuencias se editaron y ensamblaron mediante el software DNA baser (Heracle BioSoft S.R.L.). Posteriormente, se compararon con secuencias depositadas en la base de datos del NCBI utilizando la herramienta BLAST y se seleccionaron las secuencias homólogas para los análisis filogenéticos. Para esto, las secuencias se alinearon utilizando GUIDANCE (26), por medio del algoritmo MAFFT y un “Bootstrap” de 100 repeticiones. El alineamiento obtenido se cortó a un tamaño de 432 pb por medio del programa MEGA 5.2 (27), y se determinó el modelo de sustitución de nucleótidos utilizando jModelTest 2.1.4 (28). Se seleccionó el modelo HKY gamma (Hasegawa-Kishino-Yano), y se construyó el árbol filogenético correspondiente con el programa Mr Bayes 3.2 (gen= 2×10^6 , temp= 0,2, DS=0,003) (29,30).

RESULTADOS

Se colectaron 1376 mosquitos, la mayoría de los cuales procedieron de galerías forestales periféricas a cultivos de piña (Cuadro 1). La distribución de las especies identificadas en los tres ambientes de colecta no fue homogénea ($\chi^2= 145,072$; gl=12; $p<0,0001$); y la biodiversidad fue mayor en las áreas de cultivo cercanas a las galerías forestales ($H':1,39$), decreciendo de manera progresiva al alejarse de los campos de cultivo ($H':1,1$ en viviendas en proximidad y $H':0,75$ en viviendas en lejanía).

Cuadro 1. Abundancia absoluta y relativa de las especies adultas encontradas por sitio de colecta. La Virgen, Sarapiquí, Costa Rica, julio de 2014.

Especie	Ambiente de colecta			Total n (%)
	Zona forestal colindante piñera n (%)	Viviendas en proximidad n (%)	Viviendas en lejanía n (%)	
<i>Aedes albopictus</i>	73 (6,06)	5 (7,46)	2 (1,90)	80 (5,81)
<i>Anopheles apicimacula</i>	66 (5,48)	1 (1,49)	2 (1,90)	69 (5,01)
<i>Culex coronator</i>	144 (11,96)	9 (13,43)	6 (5,71)	159 (11,55)
<i>Culex inflicus</i>	83 (6,89)	1 (1,49)	0 (0,00)	84 (6,10)
<i>Culex nigripalpus</i>	612 (50,83)	24 (35,82)	26 (24,76)	662 (48,11)
<i>Culex quinquefasciatus</i>	226 (18,77)	27 (40,30)	68 (64,76)	321 (23,34)
<i>Limatus durhamii</i>	0 (0,00)	0 (0,00)	1 (0,95)	1 (0,07)
Total	1204 (100,0)	67 (100,0)	105 (100,0)	1376 (100,0)

Ae. albopictus se capturó en los tres ambientes estudiados, sin embargo, un 91,5% de los individuos colectados de esta especie (73/80) provino de las galerías forestales colindantes con piñeras, lo que representó un 6,06% del total de mosquitos obtenidos en este sitio (Cuadro 1). La colecta de *Ae. albopictus* en viviendas en proximidad y en lejanía representó un 7,46% y un 1,90% del total de mosquitos respectivamente. *Culex nigripalpus* fue la especie más abundante en galerías forestales (50,83%), mientras que *Culex quinquefasciatus* figuró como la especie colectada con mayor frecuencia en viviendas, tanto en proximidad (40,30 %) como en lejanía (64,76 %) (Cuadro 1).

Bajo las condiciones del estudio, solamente en una planta de uno de los conglomerados se observaron dos larvas de *Ae. albopictus*. En relación con la infestación larvaria de viviendas, se evaluaron 54 viviendas; 26 (48,1%) en proximidad y 28 (51,8%) en lejanía con respecto a los cultivos de piña. El IV para *Ae. albopictus* en las viviendas en proximidad fue de 40,7%, en tanto que para las viviendas en lejanía fue de 51,7%. Estos índices no mostraron diferencias estadísticamente significativas ($Z=0,56$; $p=0,58$). Con respecto a los IC, éstos fueron 26,9% para las viviendas en proximidad y 29,6%, para las viviendas en lejanía. Estos índices tampoco mostraron diferencias estadísticamente significativas

($Z=0,16$; $p=0,87$). La mayoría de los criaderos positivos por *Ae. albopictus* estuvieron representados por objetos misceláneos dentro de la categoría “otros”, donde se incluyeron juguetes, piezas de chatarra y artefactos diversos, seguidos por llantas y cocos (Figura 1).

Dos de 19 grupos de cabezas de hembras fueron positivos para DENV por RT-PCR y confirmados por secuenciación. La secuencia de uno de estos grupos (14T) tuvo un porcentaje de similitud de 100% (438/438) con un DENV-3 procedente de Venezuela (KF955487.1). La secuencia del otro grupo de cabezas (19T) tuvo un porcentaje de similitud de 99,54% (435/437) con un DENV-2 procedente de Jamaica (M20558.1). No se detectó DENV en el grupo de machos que se analizó. Por otra parte, 2 de 74 “pooles” de larvas fueron también positivos para DENV. En ambos casos (T2A y T7A), las secuencias tuvieron el mayor porcentaje de similitud, 99,34% (454/457) y 99,78% (444/445) respectivamente, con una secuencia de DENV-1 de Nicaragua (KF973470.1). El árbol filogenético presentó evidencia visual de lo obtenido mediante la herramienta BLAST y se observó además la cercanía de las secuencias del presente estudio con DENV de otros países del continente americano (Figura 2). Las secuencias obtenidas fueron depositadas en la base de datos del NCBI con los números de acceso del KX544820 al KX544823.

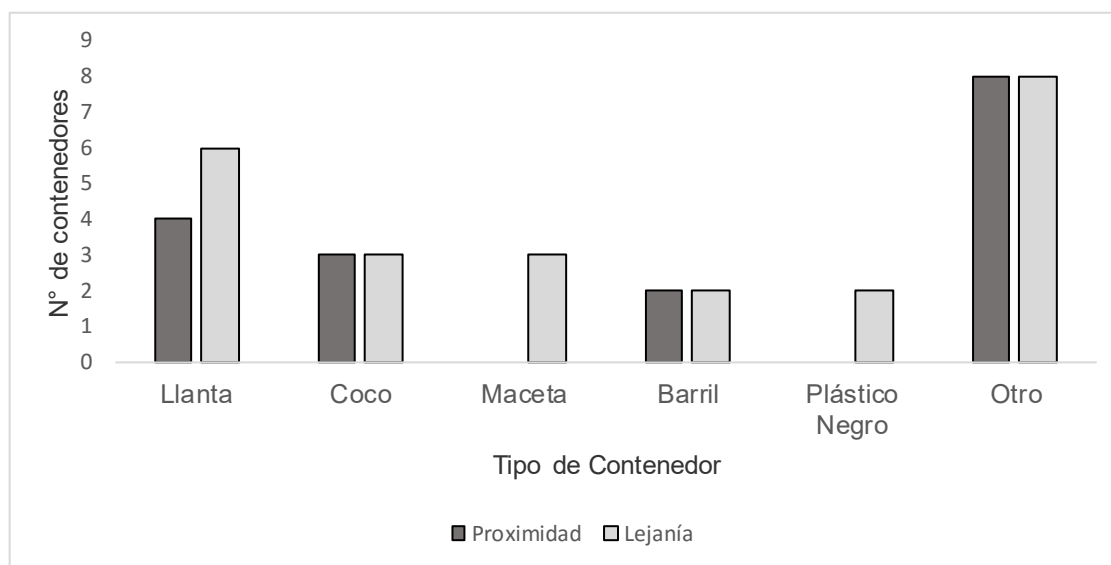


Figura 1. Contenedores positivos a *Ae. albopictus* ubicados en viviendas en proximidad y en lejanía a los cultivos de piña.

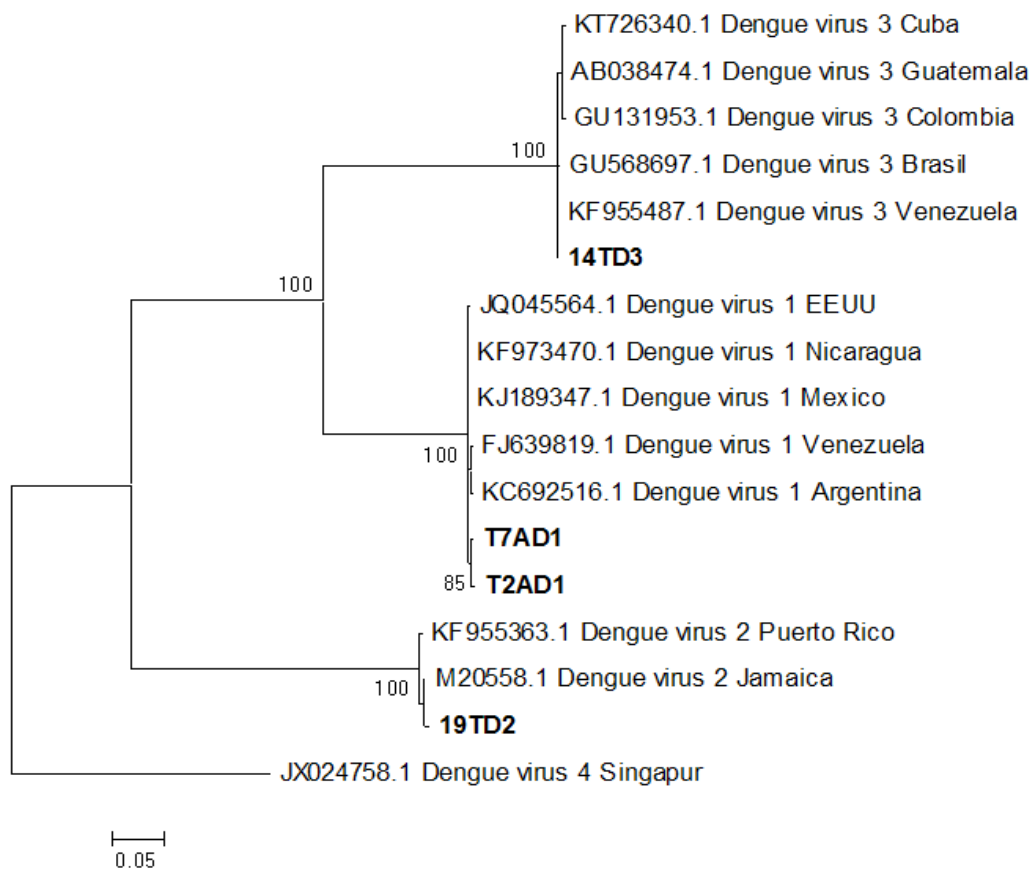


Figura 2. Árbol filogenético basado en una porción de los genes que codifican para de la cápside y premembrana viral (C/prM). Se observa el agrupamiento de las secuencias del presente estudio con secuencias de DENV de otras regiones del mundo.

DISCUSIÓN

Aunque la introducción de *Ae. albopictus* al continente americano tuvo lugar apenas hace tres décadas, su expansión en este territorio ha sido rápida y exitosa (3). Esta especie ha llegado a formar parte de las comunidades de culícidos en diferentes ecosistemas, los cuales a su vez pueden incluir los ambientes sinantrópicos de carácter urbano ocupados por *Ae. aegypti*. No obstante, se ha reportado que *Ae. albopictus* también tiene la posibilidad de vivir en entornos rurales y silvestres (2), lo cual coincide con el presente estudio, en el que *Ae. albopictus* formó parte de las especies observadas en las galerías forestales ubicadas en la periferia a los cultivos de piña, así como en viviendas localizadas en su proximidad y en su lejanía. Diversas investigaciones han demostrado que especies de plantas bromeliáceas, incluyendo la piña, son ambientes vinculados con el desarrollo larval de mosquitos como *Ae. albopictus* (17,31). Sin embargo, en el presente trabajo no se pudo evidenciar que, bajo las condiciones ambientales propias del lugar durante la colecta, el sistema de cultivo fuera permisivo para este vector. Posiblemente, la escasa cantidad de agua, el exceso de sedimentos resultante de la aplicación de abonos orgánicos y la fuerte radiación solar en esta zona, hacen que estas plantas sean ambientes poco estables para el desarrollo larval. No obstante, la mayor abundancia de adultos de *Ae. albopictus* en las galerías forestales, comparada con las viviendas, sugiere que este ambiente es altamente adecuado para los adultos, lo que coincide con estudios en otras regiones (32). En este sentido, la fragmentación del hábitat a causa de la expansión de monocultivos podría hacer que las galerías forestales periféricas se comporten como “islas ecológicas”, donde el ambiente sombreado podría brindar los sitios de reposo y refugio adecuados para los adultos de *Ae. albopictus*. Además, en este ecosistema se podrían encontrar diferentes especies de vertebrados (incluyendo primates, roedores, aves, entre otros) que servirían como fuentes de sangre alternativa para las hembras. En el análisis efectuado, la biodiversidad de culícidos adultos fue mayor en las galerías forestales con respecto a la observada en las viviendas. En estos ambientes, la especie dominante fue *Culex*

nigripalpus seguida de *Cx. quinquefasciatus*. Ambas especies son marcadamente zoofílicas, aunque también pueden picar al ser humano. Por esto han sido consideradas especies transmisoras de arbovirus, como por ejemplo el virus del Nilo Occidental (33,34). A pesar de que *Ae. albopictus* no mostró una dominancia, su presencia en estos ambientes evidencia su capacidad de adaptación a ecotopos silvestres, donde las densidades humanas pueden ser relativamente bajas. En observaciones efectuadas en años previos, se documentaron densidades muy altas de *Ae. albopictus* en estas mismas regiones (16), por lo que estas poblaciones podrían facilitar la colonización de áreas urbanas cercanas. En un estudio efectuado en Río de Janeiro, Brasil, se pudo constatar que existen áreas silvestres en entornos urbanos, las cuales pueden albergar altas densidades de adultos de *Ae. albopictus* y dado su potencial de desplazamiento, dichas poblaciones pueden promover la colonización de las viviendas ubicadas en zonas periféricas a estas áreas silvestres (35).

En cuanto a infestación larval, tanto las viviendas ubicadas en proximidad como las que se ubicaron en lejanía, mostraron la presencia de *Ae. albopictus*. Este hallazgo podría obedecer al alto potencial adaptativo a ambientes sinantrópicos que muestra esta especie. Aunque *Ae. aegypti* es otra especie que ha sido documentada por el Ministerio de Salud previamente en la zona (Marín R, Comunicación personal), su hallazgo no tuvo lugar en el presente estudio. En este sentido, algunos trabajos han podido demostrar que *Ae. albopictus* muestra ventajas competitivas sobre *Ae. aegypti* en lo que respecta a supervivencia en criaderos cuando estos se encuentran en una condición de infestación mixta (36); por lo que esta puede ser una de las razones que podría estar vinculada con la ausencia de formas larvales de *Ae. aegypti* en el presente estudio.

En Costa Rica, el dengue constituye la principal enfermedad de transmisión vectorial y desde su introducción en 1993 hasta octubre del 2018, se han reportado 371 148 casos, con un máximo de 49 993 casos en el año 2013 (37). El cantón de Sarapiquí, incluyendo el distrito La Virgen, ha sido un escenario endémico para la transmisión de dengue

(37, 38), evidenciado por la documentación de 2485 casos en el período comprendido entre 2013 y 2017 (37) y el hallazgo de vectores infectados por DENV, inmersos en este hábitat que posee las condiciones ambientales idóneas para su reproducción. La evidencia de DENV en poblaciones de *Ae. albopictus* es un hallazgo reiterativo en la zona. En un estudio previo efectuado en el mismo ecosistema, se evidenció la presencia de ARN viral correspondiente a DENV-1, DENV-2 y DENV-4 en grupos hembras y en un grupo de machos de esta especie (16). El hallazgo de machos positivos observado en dicho estudio demuestra que la transmisión vertical ha tenido lugar en la propagación viral dentro de este ecosistema. En el presente estudio, se identificaron tres serotipos (DENV-1, DENV-2 y DENV-3), lo que denota una situación de hiperendemicidad y coincide con los serotipos reportados como circulantes para el año 2014 en el país (39). Además, el hallazgo de larvas naturalmente infectadas demuestra, una vez más, la ocurrencia de transmisión vertical como uno de los mecanismos de propagación viral.

Dado que la densidad de población humana es baja en la zona de estudio, surge la interrogante de cuál sería la principal fuente de sangre para las hembras de *Ae. albopictus*, especialmente dentro de las galerías forestales, así como los posibles sitios de desarrollo larval en ese ambiente. Asimismo, se recomienda investigar todas las demás condiciones, desde un punto de vista ecológico/epidemiológico, que promueven la circulación de DENV en este tipo de ecosistemas y que podrían permitir la transmisión de otros virus emergentes como CHIKV y ZIKV.

Agradecimientos

Los autores desean manifestar su agradecimiento a la OPS/OMS Costa Rica por el aporte de insumos para esta investigación y a la Vicerrectoría de Investigación de la Universidad de Costa Rica por su apoyo al proyecto 803-B4-054.

REFERENCIAS

1. Rai K. *Ae. albopictus* in the Americas. Annu Rev Entomol. 1991; 36:459-84
2. Gratz NG. Critical review of the vector status of *Ae. albopictus*. Med Vet Entomol. 2004; 18:215-27.
3. Calderón-Arguedas O, Avendaño A, López-Sánchez W. Expansion of *Ae. albopictus* Skuse in Costa Rica. Rev Ibero-Latinoamer Parasitol. 2010; 69:220-22.
4. Marín-Rodríguez R, Díaz-Ríos M, Álvarez-Gutiérrez Y, Calderón-Arguedas O. Sitios de cría de *Aedes aegypti* (Linnaeus) y distribución geográfica de *Aedes albopictus* (Skuse) en la provincia de Limón, Costa Rica. 2012. Rev Cubana Med Trop. 2014; 66:219-27.
5. Marín-Rodríguez R., Calderón-Arguedas O, Díaz Ríos M, Duarte Solano G, Valle-Arguedas J, Troyo-Rodríguez A. Primer hallazgo de *Aedes albopictus* Skuse en el Gran Área Metropolitana de Costa Rica. Rev Costarr Salud Pública. 2014; 23:1-4.
6. Rojas-Araya D, Marín-Rodríguez R, Gutiérrez-Alvarado M, Romero-Vega LM, Calderón-Arguedas O, Troyo A. Nuevos registros de *Aedes albopictus* en cuatro localidades de Costa Rica. Rev Bioméd. 2017; 28:79-88.
7. Rai KS. *Ae. albopictus* in the Americas. Annu Rev Entomol. 1991; 36:459-84.
8. Grard G, Caron M, Mombo IM, Nkoghe D, Ondo SM, Jiolle D. Zika virus in Gabon (Central Africa)-2007. A new threat from *Aedes albopictus*? PLoS Negl Trop Dis. 2014; 8:e2681. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0002681>
9. Di Luca M, Severini F, Toma L, Boccolini D, Romi R, Remoli ME, *et al.* Experimental studies of susceptibility of Italian *Aedes albopictus* to Zika virus. Euro Surveill. 2016;21:30223. <http://dx.doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2016.21.18.30223>
10. Cancrini G, Frangipane di Regalbano A, Ricci I, Tessarin C, Gabrielli S, Pietrobelli M. *Aedes albopictus* is a natural vector of *Dirofilaria immitis* in Italy. Vet Parasitol 2003; 30:118:195-202.
11. Paupy C, Girod R, Salvan M, Rodhaim F, Failloux AB. Population *Aedes albopictus* from La Réunion Island (Indian Ocean) with respect to susceptibility to dengue virus. Heredity. 2001; 87:278-83.
12. Effler PV, Pang L, Kitsutani P, Vorndam V, Nakata M, Ayers T, *et al.* Dengue fever. Hawaii, 2001-2002. Emerg Infect Dis. 2005; 11:742-9.
13. Ramchurn SK, Moheput K, Goorah SS. An analysis of a short-lived outbreak of dengue fever in Mauritius. Euro Surveill. 2009; 14:19314.
14. Maglianesi Sandoz MA. Desarrollo de las piñeras en Costa Rica y su impacto sobre ecosistemas naturales y agro urbanos. Biocenosis. 2013; 27:62-70.
15. Herrero MV, Montes-Pico L, Hernández R. Abundancia relativa de *Stomoxys calcitrans* (L.) (Diptera: Muscidae) en seis localidades del Pacífico Sur de Costa Rica. Rev Biol Trop. 1991; 39:309-10.
16. Calderón-Arguedas O, Troyo A, Moreira-Soto R, Marín R, Taylor L. Dengue viruses in *Aedes albopictus* Skuse from a pineapple plantation in Costa Rica. J Vector Ecol. 2015; 40:184-6.

17. Eapen A, Ravindarn KJ, Dash AP. Breeding potential of *Ae. albopictus* (Skuse 1895) in chikungunya affected areas in Kerala, India. *Indian J Med Res.* 2010; 132:733-5.
18. Solano J, Villalobos R. Aspectos fisiográficos aplicados a un bosquejo de regionalización geográfico climático de Costa Rica. *Top Meteor Oceanog.* 2001; 8:26-39.
19. Darsie RF. Keys to mosquitoes of Costa Rica (Diptera, Culicidae). Columbia: International Center for Disease Control, University of South Carolina; 1993. 58 p.
20. Rueda LM. Pictorial keys for the identification of mosquitoes (Diptera: Culicidae) associated with dengue virus transmission. *Zootaxa.* 2004;589:1-60.
21. Daniel WW. Bioestadística: Base para el análisis de la salud. 3ra ed. México DF: Limusa; 1988.
22. Pla L. Biodiversidad: Inferencia basada en el índice de Shannon y la riqueza. *Interciencia.* 2006;31:583-90.
23. Organización Mundial de la Salud (OMS), Programa Especial para Investigación y Capacitación en Enfermedades Tropicales (TDR). Dengue. Guías para el diagnóstico, tratamiento, prevención y control. Genova: OMS/TDR; 2010.
24. Lanciotti RS, Calisher CH, Gubler DJ, Chang GJ, Vorndam AV. Rapid detection and typing of dengue viruses from clinical samples by using reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol.* 1992;30:545-51.
25. De Thoisy B, Lacoste V, Germain A, Muñoz-Jordán J, Colón C, Mauffrey JF, *et al.* Dengue infection in neotropical forest mammals. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2009; 9:157-70.
26. Penn O, Privman E, Ashkenazy H, Landan G, Graur D, Pupko T. GUIDANCE: a web server for assessing alignment confidence scores. *Nucleic Acids Res.* 2010;38: W23-8.
27. Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol.* 2011; 28:2731-9.
28. Darriba D, Taboada GL, Doallo R, Posada D. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods.* 2012; 9:772.
29. Huelsenbeck JP, Ronquist F. MRBAYES: Bayesian inference of phylogeny. *Bioinformatics.* 2001; 17:754-5.
30. Ronquist F, Huelsenbeck JP. MRBAYES 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics.* 2003; 19:1572-4.
31. Goulart-Mocellin M, César-Simões T, Fernandes-Silva do Nascimento T, Franca-Teixeira ML, Lounibos LP, de Oliveira RL. Bromeliad-inhabiting mosquitoes in an urban botanical garden of dengue endemic Rio de Janeiro. Are bromeliads productive habitats for the invasive vectors *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*? *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2009;104:1171-6.
32. Lourenço-de-Oliveira R, Castro MG, Braks MA, Lounibos LP. The invasion of urban forest by dengue vectors in Rio de Janeiro. *J Vector Ecol.* 2004; 29:94-100.
33. Vitek CJ, Richards SL, Mores CN, Day JF, Lord CC. Arbovirus transmission by *Culex nigripalpus* in Florida. *J Med Entomol.* 2008; 45:483-93.
34. Kuno G, Chang GJ. Biological transmission of arboviruses: Reexamination of and new insights into components, mechanisms, and unique traits as well as their evolutionary trends. *Clin Microbiol Rev.* 2005; 18:608-37.
35. Honorio NA, Goncalves-Castro M, Monteiro de Barros FS, Magalhaes M, Sabroza PC. The spatial distribution of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in a transition zone, Rio de Janeiro, Brazil. *Cad Saúde Pública.* 2009; 25:1203-14.
36. Camara DCP, Codeço CT, Juliano SA, Lounibos LP, Riback TIS, Pereira GR, *et al.* Seasonal differences in density but similar competitive Impact of *Aedes albopictus* (Skuse) on *Aedes aegypti* (L.) in Rio de Janeiro, Brazil. *PLoS ONE* 2016;11:e0157120. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0157120>
37. Ministerio de Salud, Vigilancia de la Salud. Dengue 2013-2018. [en línea] 2018. [Fecha de acceso 6 de noviembre del 2018]. Disponible en: <https://www.ministeriodesalud.go.cr/index.php/vigilancia-de-la-salud/analisis-de-situacion-de-salud>
38. González-Elizondo, M. 2014. Informe de vigilancia basada en laboratorio. Datos de análisis serológicos y serotipos circulantes de dengue Costa Rica, enero-diciembre, 2014. INCIENSA, Centro Nacional de Referencia de Virología. [en línea] 2015. [Fecha de acceso 6 de noviembre del 2018]. Disponible en URL: https://www.inciensa.sa.cr/vigilancia_epidemiologica/informes_vigilancia/2014/Virologia/Informe%20anual%20de%20vigilancia%20basada%20en%20laboratorio%20de%20dengue%202014.pdf.
39. Organización Panamericana de la Salud (OPS). Dengue: Datos, mapas y estadísticas de OPS/OMS. [en línea] 2009. [Fecha de acceso 16 de febrero del 2017]. Disponible en: URL: http://www.who.int/topics/dengue/9789995479213_spa.pdf