

Identificación de arbovirus en mosquitos vectores (*Aedes spp.*) de Oaxaca mediante qRT-PCR.

Ramírez-Palacios LR,¹ Landeta-Velázquez S,¹ Miguel-López G,¹ Martínez-Muñoz JP,¹ Cruz-Altamirano E,¹ Tapia-Pastrana G¹

¹Laboratorio Estatal de Salud Pública de Oaxaca

Correspondencia:

D. en C. Luis Román Ramírez Palacios

Laboratorio Estatal de Salud Pública de Oaxaca
Carretera Oaxaca a Sola de Vega Kilómetro 18.5, Reyes Mantecón C.P. 71295
San Bartolo Coyotepec, Oax.

Teléfono: 01 951 546 0015

Correo-e:
romanpalaciosmc@gmail.com

Resumen

Introducción: El virus del Dengue (DENV) es el principal arbovirus en México, del 2014 al 2017 se presentaron 79,743 casos en México (3% en Oaxaca); en 2015 se reportaron los primeros casos de virus Chikungunya (CHIKV) en México y hasta finales de 2016 se registraron 1,209 casos en Oaxaca. El virus Zika (ZIKV) comenzó a circular en nuestro país a finales de 2015, alcanzando 8,174 casos en 2016 (6% en Oaxaca).

Material y Métodos: Se realizó un estudio transversal, observacional para identificar *Aedes spp.* en 7 localidades de Oaxaca y su infección por arbovirus (DENV, CHIKV y ZIKV) mediante qRT-PCR.

Resultados: Se capturaron e identificaron *Aedes aegypti* en todas las localidades estudiadas y *Aedes albopictus* en la de la región Costa; se identificó ZIKV y DENV-1 en *A. aegypti*, cocirculación de DENV-1 y ZIKV en *A. aegypti* y se describe por primera vez, la presencia de ZIKV en *A. albopictus*.

Conclusiones: La presencia de mosquitos *A. aegypti* y *A. albopictus* infectados con arbovirus en algunas localidades indican un potencial muy alto para el establecimiento de las 2 especies con el correspondiente riesgo del incremento de brotes por arbovirus y la potencial presentación de coinfecciones que dificulten el diagnóstico clínico. Aportaciones a la salud: Se describe la circulación y cocirculación de DENV y ZIKV en algunas localidades; también, se reconoció la distribución vectorial (*Aedes spp.*) incluyendo la descripción de *Aedes albopictus* en la región costa del estado, además del primer reporte de dicho vector infectado con ZIKV en Oaxaca.

Palabras clave: Virus Dengue, Arbovirus, PCR en tiempo real, *Aedes spp.*

Identification of arboviruses in mosquito vectors (*Aedes spp.*) of Oaxaca using qRT-PCR.

Abstract

Introduction: Dengue virus (DENV) is the main arbovirus in Mexico, from 2014 to 2017 found 79,743 cases in Mexico (3% in Oaxaca); In 2015, the first cases of Chikungunya virus (CHIKV) were reported in Mexico and up to the end of 2016 there were 1209 cases registered in Oaxaca. Zika virus (ZIKV) began to circulate in our country at the end of 2015, reaching 8,174 cases in 2016 (6% in Oaxaca).

Material and Methods: A cross-sectional, observational study was conducted to identify *Aedes spp.* in 7 localities of Oaxaca and arboviruses (DENV, CHIKV and ZIKV) infection using qRT-PCR.

Results: *Aedes aegypti* were captured and identified in all the studied localities and *Aedes albopictus* in the Costa region; ZIKV and DENV-1 were identified in *A. aegypti*, co-circulation of DENV-1 and ZIKV in *A. aegypti* and the presence of ZIKV in *A. albopictus* was described for the first time.

Conclusions: The presence of *A. aegypti* and *A. albopictus* mosquitoes infected with arboviruses in some localities indicate a very high potential for the establishment of the 2 species with the corresponding risk of increased outbreaks by arboviruses and the potential presentation of coinfections that difficult the clinical diagnosis. Circulation and co-circulation of DENV and ZIKV in some localities is described, shows the vectorial distribution (*Aedes spp.*) including the *Aedes albopictus* description in the state coast region, beside the first report of that vector infected with ZIKV in Oaxaca.

Keywords: Dengue Virus, Arboviruses, Real-Time Polymerase Chain Reaction, *Aedes*.



Introducción

Los arbovirus (*arthropod borne virus*) son virus transmitidos por artrópodos o insectos, estos incluyen una gran variedad de virus de Ácido Ribonucleico (ARN), entre los que destacan, por los brotes emergentes a nivel mundial y en México, Alfavirus, principalmente CHIKV y Flavivirus como DENV y ZIKV.^{1,2,3,4} Se conocen 2 ciclos de vida en los arbovirus, el ciclo silvestre o selvático y el ciclo urbano; el primero involucra mamíferos como primates y roedores, y vectores hematófagos como garrapatas, moscas y mosquitos de diferentes géneros y especies.⁵ El ciclo urbano, por su parte, involucra reservorios accidentales como el humano, animales domésticos y ganado además de vectores antropófilos como mosquitos *A. aegypti* y *A. albopictus*. La infección de los vectores se da de forma vertical, que implica la transmisión del virus del mosquito hacia los huevecillos, u horizontal durante la cópula o cuando la hembra se alimenta de mamíferos infectados.⁵ Los humanos se exponen a los arbovirus cuando invaden ambientes rurales, o bien cuando un vector infecta animales domésticos que sirven como reservorios y fuente de infección a mosquitos antropófilos los cuales inician el ciclo urbano.⁶

El dengue es el principal arbovirus en México, entre los años 2014 a 2017 el número de casos registrados fueron 79,743 en todo el país (3% en Oaxaca) según, SINAVE.⁴ Históricamente se ha considerado a Oaxaca zona endémica del DENV; se sabe de la presencia de DENV-1 desde 1979 y de DENV-2 y DENV-4 desde 1982.⁷ En comunidades como Puerto Escondido, Pinotepa Nacional, Salina Cruz y Huatulco se han identificado los DENV-1 y DENV-2 (variedad Asiático-Americano) asociados a cuadros hemorrágicos^{8,9,10} y recombinaciones genéticas del DENV-2 (variedad Asiático-Americano) en regiones del Istmo de Tehuantepec.¹¹ Actualmente se han reportado todos los serotipos en el estado.⁴

A partir de 2004, otros arbovirus como CHIKV y ZIKV comenzaron a expandirse por todo el mundo. En 2015 se reportaron los primeros casos de CHIKV en México con un total de 13,185 casos (1,209 casos en Oaxaca). Los primeros casos de ZIKV comenzaron en nuestro país a finales de

2015, alcanzando un total de 8,174 casos hasta finales de 2016; de éstos, el 6 % pertenecieron a Oaxaca.^{2,3}

La sintomatología asociada a estos arbovirus se caracteriza por cuadros febriles indiferenciados con presencia de mialgias, artralgias, cefalea, exantema y en ocasiones complicaciones clínicas como síndromes hemorrágicos, e inclusive microcefalia y síndromes autoinmunes. En Oaxaca, durante 2018 se reportó la asociación del CHIKV con desórdenes autoinmunes como lupus eritematoso¹² y de 2016 a 2017 se reportaron 198 casos de Zika en mujeres embarazadas y dos casos de microcefalia con una defunción.^{2,13}

Con respecto a los vectores se ha demostrado la presencia de variabilidad genética en mosquitos *A. aegypti* en el estado de Oaxaca en regiones del Istmo de Tehuantepec y costa asociada a brotes epidémicos^{8,14,15} y la transmisión vertical de DENV en *A. aegypti*.¹⁶ En 2016, se informó de la presencia de *A. albopictus* en el estado sin especificar regiones.¹⁷ Entre las estrategias actuales avaladas por la Organización Mundial de la Salud (OMS), Organización Panamericana de la Salud (OPS) y el Centro de Control de Enfermedades (CDC) para la prevención y erradicación de las arbovirosis se encuentra la vigilancia entomoviológica que consiste en la identificación de arbovirus en vectores por métodos moleculares como la RT-PCR en tiempo real (*qRT-PCR*) con el fin de generar información de la distribución de vectores y la circulación por uno o más arbovirus que ayude a predecir, prevenir e identificar zonas de riesgo a infección o coinfección por arbovirus y al establecimiento de nuevas arbovirosis.^{18,19}

Las condiciones climáticas del estado de Oaxaca favorecen el desarrollo de mosquitos entre ellos los del género *Aedes*, estos pueden actuar como vectores de DENV, CHIKV y ZIKV. Está documentada la circulación de DENV-1 y DENV-2 en localidades como Puerto escondido, Pinotepa y Huatulco asociadas a cuadros hemorrágicos^{8,9,10} y recombinaciones genéticas del DENV-2 (variedad Asiático-Americano) en regiones del Istmo de Tehuantepec.¹¹ Oaxaca es una zona endémica del DENV con una gran cantidad de casos y presencia de todos los serotipos demostrada en los últimos años.⁴

DETALLES DEL ARTÍCULO

Recibido: 1/agosto/2018

Aceptado: 1/septiembre/2018

Cómo citar este artículo:

Ramírez-Palacios LR, Landeta-Velázquez S, Miguel-López G, Martínez-Muñoz JP, Cruz-Altamirano EI, Tapia-Pastrana G. Identificación de arbovirus en mosquitos vectores (*Aedes spp.*) de Oaxaca mediante qRT-PCR. *Avan C Salud Med* 2018; 5 (3): 68-78.

A partir de 2015 el CHIKV se introdujo en el estado y en 2016 apareció el ZIKV. A pesar de los reportes de gran cantidad de casos clínicos de estas tres arbovirosis aunado a la presentación de complicaciones asociadas tales como microcefalia, síndromes autoinmunes y síndromes hemorrágicos, a nivel estatal no existe información de la presencia de vectores y su infección por arbovirus mediante métodos moleculares avalados por la OMS, OPS y CDC como la *qRT-PCR* en tiempo real para la identificación de arbovirus.

La información derivada de esta investigación permitirá evaluar la presencia de vectores transmisores de DENV, CHIKV, ZIKV y potencialmente de otras arbovirosis en algunas localidades del estado de Oaxaca; además de esto y considerando que la vigilancia virológica a través de métodos moleculares como la *qRT-PCR* permiten por su elevada sensibilidad y especificidad analíticas la identificación rápida y precisa de la circulación de arbovirus; esto puede coadyuvar, a que en conjunto con instancias gubernamentales se establezcan mecanismos de vigilancia que permitan desarrollar acciones preventivas muy bien dirigidas hacia el control del vector infectado, aunado a la identificación de las localidades en las que la población está en riesgo de sufrir una infección o coinfección o bien al establecimiento de una epidemia por los arbovirus circulantes identificados.

En el presente estudio se pretende reconocer la distribución de vectores de arbovirosis en algunas localidades del estado y la identificación de su infección por arbovirus con el fin de evaluar el riesgo de la población a sufrir infecciones o coinfecciones por los virus Dengue, Zika y Chikungunya. El objetivo fue identificar DENV, CHIKV y ZIKV mediante *qRT-PCR* en vectores del género *Aedes spp.* capturados en comunidades del estado de Oaxaca.

Material y métodos

Se realizó un estudio transversal y observacional, con muestreo por conveniencia de mosquitos adultos hembras del género *Aedes* (Mayo a Septiembre de 2016) en localidades de Oaxaca (Rio Grande, Bajos de Chila, Puerto Escondido, Pochutla, Oaxaca de Juárez, Santa Lucia del camino y San Antonio de la Cal).

Se incluyeron todos los mosquitos adultos hembras vivas identificados taxonómicamente²⁰ como pertenecientes al género *Aedes (aegypti o albopictus)* colectados en alguna de las localidades incluidas en el diseño del estudio; se excluyeron a todos los mosquitos adultos machos vivos identificados taxonómicamente²⁰ como pertenecientes al género *Aedes (aegypti o albopictus)* y todos los mosquitos adultos hembras vivos que no pertenezcan al género *Aedes* colectados en alguna de las localidades incluidas en el diseño del estudio. Se eliminaron del estudio a todos los mosquitos adultos hembras identificados taxonómicamente²⁰ como pertenecientes al género *Aedes (aegypti o albopictus)* colectados en alguna de las localidades incluidas en el diseño del estudio y que hayan muerto antes de su análisis.

Captura e identificación de vectores: Se capturaron mosquitos adultos del género *Aedes spp.* utilizando muestreo aleatorio estratificado en cada sitio de captura.¹⁸ La captura se realizó en el interior de viviendas y áreas periféricas por 3 horas manteniéndose vivos hasta su análisis. La identificación taxonómica y del sexo del mosquito se realizó por sus características morfológicas.²⁰ Por cada sitio de captura se formaron pools de mosquitos que se colocaron en recipientes para su preservación. La cantidad de mosquitos capturados por especie en cada localidad se sometió a un análisis estadístico de *Kruskal-Wallis* para comparación de poblaciones y los resultados de captura por especie se expresaron mediante estadística descriptiva con Microsoft Excel 2010.

Extracción de ARN: Los mosquitos se colocaron por 10 minutos a -80°C y se formaron los pools con un mínimo de 20 mosquitos por pool y se depositaron en un tubo con 1.5 ml de medio de transporte viral. Los mosquitos fueron homogeneizados (*TissueRuptor, QIAGEN*) y se centrifugaron a 14,000 rpm por 10 min (Centrifuga, *Microfuge 20R, Beckman Coulter*) y se conservó el sobrenadante. La extracción del ARN viral se realizó a partir del sobrenadante obtenido utilizando el kit QIAamp® Viral RNA Mini Kit (QIAGEN) siguiendo las indicaciones del fabricante y el templado obtenido se eluyó hasta un volumen de 60µl almacenándose a -80 °C hasta su uso. La pureza del ARN se evaluó mediante la relación (260/280 nm) obtenida del ARN (*BioPhotometer plus, Eppen-*



dorf) y la integridad de este se evaluó por electroforesis en gel de agarosa al 1.5%. El corrimiento del gel se realizó en una cámara de electroforesis por 30 min a 100 V y se utilizó una solución TAE 1X como amortiguador de corrimiento. Los gels se visualizaron y se documentaron en un transiluminador ultravioleta (*Benchtop 2V*).

Para la identificación de DENV, CHIKV y ZIKV se utilizaron los protocolos de Johnson²¹, Lanciotti²² y Lanciotti²³ respectivamente los cuales incluyen 6 juegos de oligonucleótidos (2 primers y 1 sonda taq-

man cada uno); cuatro de ellos (Biosearch technologies, USA) se utilizaron para identificar el ARN de los 4 serotipos del DENV, uno (Tib molbiol, USA) para identificar el ARN de CHIKV y el otro (Tib molbiol, USA) para identificar el ARN de ZIKV (Tabla 1).

Las reacciones de qRT-PCR fueron realizadas en un volumen de 25 µl en una placa óptica de reacción utilizando un termociclador ABI FAST 7500 (*Applied Biosystems*). La mezcla de amplificación para las reacciones contienen 5 µl del templado y 20 µl de la mezcla maestra de reacción (Tabla 2).

Tabla 1. Secuencias de los primers y sondas utilizados en el ensayo de qRT-PCR para la identificación de ARN de DENV²¹, CHIKV²² y ZIKV²³ en mosquitos *Aedes spp.*

Oligonucleótido	Secuencia (5´ a 3´)	Región amplificada
Primer D1F	CAA AAG GAA GTC GTG CAA TA	Proteína NS5 (DENV-1)
Primer D1C	CTG AGT GAA TTC TCT CTA CTG AAC C	
Sonda B-D1P	FAM - CAT GTG GTT GGG AGC ACG C - BHQ1	Proteína E (DENV-2)
Primer D2F	CAG GTT ATG GCA CTG TCA CGA T	
Primer D2C	CCA TCT GCA GCA ACA CCA TCT C	Proteína E (DENV-3)
Sonda B-D2P	TEXAS RED- CTC TCC GAG AAC AGG CCT CGA CTT CAA - BHQ2	
Primer D3F	GGA CTG GAC ACA CGC ACT CA	Proteína NS3B (DENV-4)
Primer D3C	CAT GTC TCT ACC TTC TCG ACT TGT CT	
Sonda B-D3P	Cy5 - ACC TGG ATG TCG GCT GAA GGA GCT TG - BHQ3	Proteína NSP4 (CHIKV)
Primer D4F	TTG TCC TAA TGA TGC TGG TCG	
Primer D4C	TCC ACC TGA GAC TCC TTC CA	Proteína E (ZIKV)
Sonda B-D4P	HEX - TTC CTA CTC CTA CGC ATC GCA TTC CG - BHQ1	
Primer 6857	TCA CTC CCT GTT GGA CTT GAT AGA	Proteína E (ZIKV)
Primer 6981c	TTG ACG AAC AGA GTT AGG AAC ATA CC	
Sonda 6920	TEXAS RED - AGG TAC GCG CTT CAA GTT CGG CG - BHQ - BHQ2	Proteína E (ZIKV)
Iniciador 1086	CCG CTG CCC AAC ACA AG	
Iniciador 1162	CCA CTA ACG TTC TTT TGC AGA CAT	Proteína E (ZIKV)
Sonda 1107-R	CAL FLUOR RED - AGC CTA CCT TGA CAA GCA GTC AGA CAC TCA A - BHQ2	

Tabla 2. Elaboración de la mezcla maestra de reacción utilizadas en el protocolo de qRT-PCR para la identificación de ARN de arbovirus en mosquitos *Aedes spp.*

DENV Reactivo	CHKV Volumen 1X (µl)	ZIKV Volumen 1X (µl)	Volumen 1X (µl)
2X PCR Master mix	12.5	12.5	12.5
Agua grado PCR	5.45	6.6	6.35
Primer Forward	0.125 (Denv-2, Denv-4); 0.25 (Denv-1 Denv-3)	0.25	0.25
Primer Reverse	0.125 (Denv-2, Denv-4); 0.25 (Denv-1 Denv-3)	0.25	0.25
Sonda	0.045	0.15	0.15
Superscript III RT/ Platinum® Taq Mix	0.5	0.25	0.5
ARN	5	5	5
Volumen final	25	25	25

Los protocolos de qRT-PCR utilizados se indican en la Tabla 3. Cada una de las ocasiones en que se realizaron los protocolos se utilizó un control positivo para cada uno de los arbovirus, un control negativo (agua grado biología molecular) y un control negativo de extracción con el fin de validar adecuadamente cada análisis.

La fluorescencia de fondo se consideró para obtener el valor correcto del ciclo umbral o corte; por esto, el umbral fue considerado por encima de la fluorescencia de fondo para cada corrida en la fase exponencial de la curva de amplificación. Los

valores de amplificación se expresaron en valores de Ct (del inglés *Cyclethreshold*), donde el Ct es el ciclo a partir del cual los valores de fluorescencia relativa rebasan el punto de corte o umbral. Para identificar a una muestra como positiva para cualquiera de los arbovirus identificados se consideró la obtención de una curva sigmoidea característica con un Ct menor o igual a 37. Los resultados de la presencia de los arbovirus en los pools de mosquitos obtenidos se expresaron como positivos o negativos y se expresaron como porcentajes donde el total de pools obtenidos represento el 100 %.

Tabla 3. Protocolos de amplificación de qRT-PCR para identificación de arbovirus en mosquitos *Aedes spp.*

DENV			CHIKV			ZIKV		
Temperatura	Tiempo	Ciclos	Temperatura	Tiempo	Ciclos	Temperatura	Tiempo	Ciclos
50°C	30 min	1	50°C	30 min	1	50°C	30 min	1
95°C	10 min	1	95°C	15 min	1	95°C	15 min	1
95°C	15 seg	45	95°C	15 seg	45	95°C	15 seg	45
60°C	1 min*		60°C	1 min*		60°C	1 min*	

*Etapa de recolección de datos

Resultados

En las 7 localidades evaluadas (Rio Grande, Bajos de Chila, Puerto Escondido, Pochutla, Oaxaca de Juárez, Santa Lucia del Camino y San Antonio de la Cal) se capturaron 1,341 mosquitos hembras del género *Aedes*. A continuación, se identificaron taxonómicamente obteniéndose 1,025 *Aedes aegypti* (76.4 %) y 316 *Aedes albopictus* (26.6 %). De acuerdo con las localidades evaluadas se ob-

tuvieron los siguientes resultados: Rio Grande (128 *A. aegypti* y 46 *A. albopictus*), Bajos de Chila (131 *A. aegypti* y 27 *A. albopictus*), Puerto Escondido (221 *A. aegypti* y 103 *A. albopictus*), Pochutla (119 *A. aegypti* y 140 *A. albopictus*), Oaxaca de Juárez (145 *A. aegypti*), Santa Lucia del camino (94 *A. aegypti*) y San Antonio de la cal (187 *A. aegypti*). En total se formaron 48 pools, 40 pertenecientes a la especie *A. aegypti* y 8 de *A. albopictus* (Tabla 4).

Tabla 4. Cuantificación e identificación de vectores en las localidades evaluadas.

Localidad	<i>Aedes spp.</i>		<i>A. aegypti</i>		<i>A. albopictus</i>	
	No. de moscos (%)	No. de Pools	No. de moscos (%)	No. de Pools	No. de moscos (%)	No. de Pools
Rio Grande	174(12.98%)	6	128(9.55%)	5	46(3.43%)	1
Bajos de Chila	158(11.78%)	6	131(9.77%)	5	27(2.01%)	1
Puerto Escondido	324(24.16%)	10	221(16.48%)	8	103(7.68%)	2
Pochutla	259(19.31%)	8	119(8.87%)	4	140(10.44%)	4
Oaxaca de Juárez	145(10.81%)	6	145(10.81%)	6	0(0%)	0
Santa Lucia del Camino	94(7.01%)	4	94(7.01%)	4	0(0%)	0
San Antonio de la Cal	187(13.94%)	8	187(13.94%)	8	0(0%)	0
Total	1341(100%)	48	1025(76.44%)	40	316(23.56%)	8

El análisis estadístico de *Kruskal-Wallis* por especie arrojó una $p > 0.05$ para mosquitos *A. aegypti* y demostró estadísticamente que no hubo diferencias significativas con respecto a la cantidad de mosquitos *A. aegypti* capturados en cada localidad; sin embargo, para *A.*

albopictus se obtuvo una $p < 0.05$ que demostró variación entre la cantidad de mosquitos *A. albopictus* capturados entre las localidades. Los datos obtenidos del análisis de frecuencia dentro de cada localidad por especie se aprecian en la tabla 5.

Tabla 5. Análisis de frecuencia de mosquitos capturados en localidades del estado de Oaxaca.

Localidad	<i>A. aegypti</i>			<i>A. albopictus</i>		
	No. de moscos (Media)	No. de moscos (Mínimo)	No. de moscos (Máximo)	No. de moscos (Mínimo)	No. de moscos (Máximo)	No. de moscos (Máximo)
Rio Grande	25.6 ± 1.1	24	27	9.2 ± 6.7	5	21
Bajos de Chila	26.2 ± 2.2	24	30	5.4 ± 2.1	2	8
Puerto Escondido	24.5 ± 3.8	15	28	11.4 ± 6.5	1	21
Pochutla	14.8 ± 10.6	3	26	17.6 ± 8.1	8	28
Oaxaca de Juárez	24.1 ± 0.54	23	26	---	---	---
Santa Lucía del Camino	23.5 ± 1.55	21	28	---	---	---
San Antonio de la Cal	23.375 ± 0.98	20	28	---	---	---

El ARN extraído a partir de mosquitos se evaluó mediante la cuantificación de la relación de la absorbancia a 260/280 nm (Tabla 6).

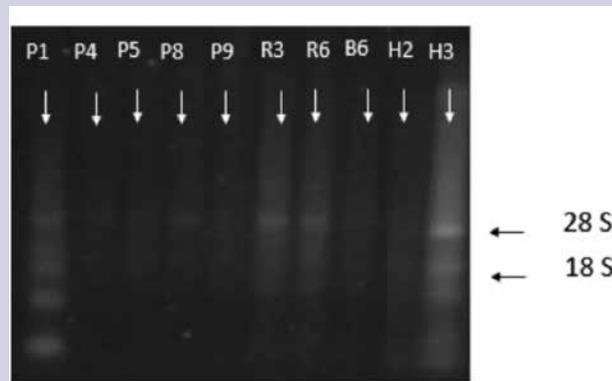
Posteriormente se realizó la evaluación de la integridad del ARN obtenido mediante electroforesis en geles de agarosa al 1.5%. En la Figura 1, se muestran resultados representativos de algunos pools en donde se observan dos bandas en

todas las muestras con una relación en tamaño 2:1 correspondientes al radio aproximado entre las subunidades 28S y 18S del ARN con lo que se comprueba que el ARN obtenido tiene una integridad aceptable.

Tabla 6. Cuantificación del ARN extraído de *Aedes* spp. Se expresa el análisis de algunos pools analizados de manera representativa.

Clave	Relación (260/280 nm)	ARN (ng/ µl)
P1	1.36	70.9
P4	1.19	67.6
P5	1.21	71.9
P8	1.48	98.9
P9	1.32	75
R3	1.21	52.2
R6	1.44	71.5
B6	1.58	50.1
H2	1.78	94.2
H3	1.73	82.8

Figura 1. Análisis electroforético de ARN de mosquitos *Aedes* spp. en gel de agarosa al 1.5%.



Artículo Original

De los 48 pools evaluados, 16 (33.33%) mostraron positividad al menos a un arbovirus. En todos los pools positivos se identificó el ZIKV (16 pools, 33.3%) de los cuales 13 pools (27.08%) correspondieron a *A. aegypti* y 3 pools (6.25%) a *A. albopictus*. Con relación a DENV, se obtuvieron 2 pools (4.16%) positivos y estos corresponden a *A. aegypti* en donde se tipificó DENV-1. De

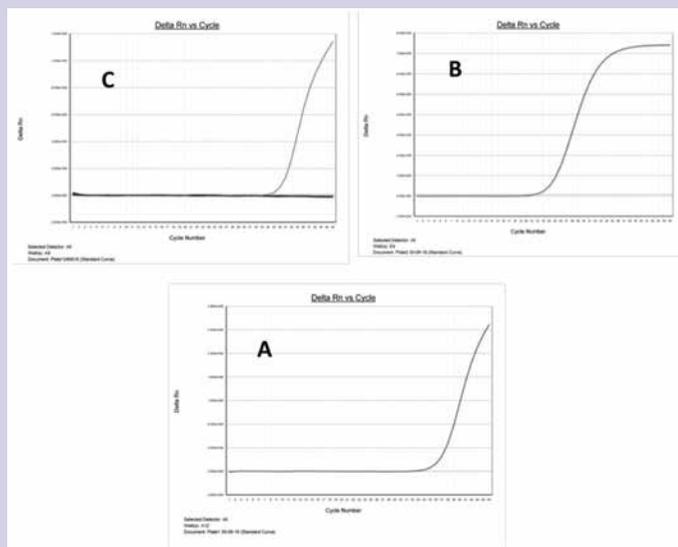
manera adicional, se encontró que en estos 2 pools también se identificó ZIKV por lo que se documenta la cocirculación de ellos en 2 de las comunidades estudiadas. En ninguno de los pools analizados se encontró CHIKV (Tabla 7) y fue relevante que todas las muestras positivas mostraron gráficas de amplificación características (Figura 2).

Tabla 7. Identificación de arbovirus en mosquitos *Aedes spp.* por localidad estudiada en el estado de Oaxaca.

Localidad	No. de Pools	<i>A. aegypti</i>			<i>A. albopictus</i>			
		DENV (+)	CHIKV (+)	ZIKV (+)	DENV (+)	CHIKV (+)	ZIKV (+)	
Rio Grande	5	0	0	3 (6.25%)	1	0	0	1 (2.08%)
Bajos de Chila	5	1* (2.08%)	0	1 (2.08%)	1	0	0	0
Puerto Escondido	8	1** (2.08%)	0	5 (10.41%)	2	0	0	2 (4.16%)
Pochutla	4	0	0	0	4	0	0	0
Oaxaca de Juárez	6	0	0	1 (2.08%)	0	0	0	0
Santa Lucia del Camino	4	0	0	1 (2.08%)	0	0	0	0
San Antonio de la Cal	8	0	0	2 (4.16%)	0	0	0	0
Total	40	2 (4.16%)	0	13 (27.08%)	8	0	0	3 (6.25%)

*En ambos pools positivos a DENV se identificó DENV-1. En estos mismos pools se identificó también ZIKV con lo que se describen la cocirculación de estos arbovirus en las localidades de Bajos de Chila y Puerto Escondido.

Figura 2. Graficas de amplificación características en la identificación de arbovirus por qRT-PCR en *Aedes spp.* A). Grafica de amplificación de DENV-1 (Ct = 34) en mosquitos *A. aegypti* (Pool P4). B). Grafica de amplificación de ZIKV (Ct = 21) en mosquitos *A. aegypti* (Pool R3). C). Grafica de amplificación de ZIKV (Ct = 33) en mosquitos *A. albopictus* (Pool P10).





Discusión

Vectores: De acuerdo con los objetivos planteados en el presente trabajo, se capturó e identificó al mosquito *A. aegypti* en todas las localidades en estudio. El hallazgo de *A. aegypti* en esta investigación coincide con reportes previos para nuestro estado⁴ así como con reportes, en localidades como Puerto Escondido y el Istmo de Tehuantepec.^{8,15,16,24} De forma adicional y cumpliendo con los objetivos planteados, aunque de manera sorpresiva, se identificó y capturó en las comunidades de Bajos de Chila, Puerto Escondido, Rio Grande y Pochutla al mosquito *A. albopictus*, vector secundario de arbovirosis como Dengue, Zika y Chikungunya.²⁵ La presencia de esta especie fue descrita por primera vez en Oaxaca en 2016 aunque sin especificar una región en particular,¹⁷ y por primera vez, durante esta investigación en las localidades evaluadas durante el mismo año. Por lo anterior, nuestro trabajo confirma la presencia de este mosquito en Oaxaca y proporciona de manera inicial datos específicos de la ubicación de este vector en el estado. La presencia de *A. albopictus* en una mayor proporción que *A. aegypti* en la localidad de Pochutla es un comportamiento previamente observado y descrito en el continente asiático, donde *A. albopictus* es capaz de coexistir y mermar a poblaciones de mosquitos *A. aegypti*²⁶ lo que demuestra el riesgo del establecimiento de esta especie en otras zonas del estado ya que las condiciones medio ambientales permiten la reproducción del género *Aedes*, incluso en zonas templadas del estado, como la Sierra Norte, donde puede habitar también. Se ha descrito que *A. albopictus* se alimenta preferentemente de mamíferos silvestres como ganado, roedores, aves y murciélagos, mismos que están presentes en las comunidades evaluadas y en otras partes del estado formando parte del ciclo silvestre de los arbovirus lo que puede facilitar el establecimiento de estas nuevas arbovirosis de forma endémica.^{6,27} La identificación de *A. aegypti* y *A. albopictus* en las localidades de estudio incrementa el riesgo de infección por arbovirus, como se ha documentado en países como Indonesia, Micronesia y Brasil donde la presencia de estos vectores está directamente relacionada con los brotes masivos de ZIKV y CHIKV en la población.²³

Identificación de arbovirus en vectores: Los resultados, en relación a los hallazgos de la infección en mosquitos con predominio de ZIKV en esta investigación, concuerdan con los reportes de casos clínicos de esta enfermedad transmitida por vector en humanos durante el 2016 en nuestro estado con respecto a otras arbovirosis, como Dengue y Chikungunya.^{2,3,4} La presencia de este arbovirus con predominio en mosquitos *A. aegypti*, confirman su comportamiento como vector principal de ZIKV mismo que ha sido asociado a brotes epidémicos alrededor del mundo durante 2016.^{28,29,30} Por otro lado, el hallazgo de ZIKV en mosquitos silvestres *A. albopictus* es el primero en Oaxaca y fue el segundo en el país durante 2016, esto destaca la importancia de este vector que en ausencia de *A. aegypti* se puede comportar como vector principal durante brotes epidémicos debidos a este virus u otros como Dengue y Chikungunya o bien potencialmente desplazarlo y ocupar el nicho estableciéndose de manera permanente.^{31,32,33} El hallazgo de ZIKV tanto en *A. aegypti* como en *A. albopictus* resalta la alta probabilidad de infección por esta arbovirosis en la población de las localidades evaluadas, y que no hay que dejar de reconocer que ha sido asociada a complicaciones reconocidas como por ejemplo dos casos de microcefalia y síndrome de Guillan-Barre, así como defunciones en Oaxaca¹³ y también en otros países como Brasil.^{34,35}

Con respecto al DENV, en los resultados obtenidos solo se demostró la circulación del DENV-1 en el vector *A. aegypti* en dos de las comunidades evaluadas (Bajos de Chila y Puerto escondido). La presencia de este serotipo coincide con reportes de investigaciones previas realizadas en Puerto Escondido y otras comunidades de la región como Pinotepa Nacional, Salina Cruz y Huatulco en donde se ha identificado el DENV-1 a partir de muestras clínicas.^{8,9,10} La identificación de DENV en menor porcentaje que ZIKV (a pesar de su reconocida endemidad) durante la presente investigación pueden atribuirse a factores como la previa inmunización a este serotipo por parte de la población lo que implica una rápida respuesta inmune con disminución de cargas virales en los reservorios o bien a la competencia vectorial entre ZIKV y DENV^{6,27} aunado a la presencia de una gran cantidad de personas susceptibles a la infección por ZIKV ya que es un arbovirus de reciente

introducción al país. La identificación de DENV-1 y ZIKV, en un mismo pool en las comunidades de Bajos de Chila y Puerto Escondido demostraron cocirculación que permea en la potencial probabilidad de una coinfección en la población, dato previamente documentado en humanos durante 2016 y asociado a cuadros clínicos atípicos derivados de la coinfección por estos arbovirus lo que dificultaría el diagnóstico clínico.^{36,37} Aunque no se identificó cocirculación del DENV y CHIKV durante la investigación, la cocirculación y coinfección en humanos particularmente con el DENV-1 se ha documentado en países como Colombia³⁸ e India,³⁹ por lo que no se excluye esta posibilidad en un futuro en las localidades evaluadas. La presencia de *A. albopictus* en todos los sitios de captura, vector principal del CHIKV durante los brotes registrados a partir de 2004 en todo el mundo^{40,41,42} y la ausencia de este arbovirus en vectores de todas las comunidades evaluadas durante el 2016 sugiere la ausencia de mamíferos silvestres (roedores, primates) que mantengan el ciclo silvestre de los arbovirus u otros factores como la competencia vectorial entre virus del Zika, Dengue y Chikungunya.^{6,27} La transmisión vertical de Chikungunya no ha sido documentada en vectores en Oaxaca y también puede contribuir a la ausencia de este arbovirus que pese al brote ocurrido en 2015 en el estado parece haber desaparecido en 2016.

Conclusiones

- Se capturaron e identificaron taxonómicamente mosquitos *A. aegypti* en las localidades de Rio Grande, Bajos de Chila, Puerto Escondido, Pochutla, Oaxaca de Juárez, Santa Lucia del camino y San Antonio de la Cal.
- Se describió por primera vez la presencia de *A. albopictus* en las localidades de Rio Grande, Bajos de Chila, Puerto Escondido y Pochutla pertenecientes a la región Costa de Oaxaca.
- Se identificó ZIKV en el mosquito *A. aegypti* en las localidades de Rio Grande, Bajos de Chila y Puerto Escondido pertenecientes a la región costa de Oaxaca y en las localidades de Oaxaca de Juárez, Santa Lucia del camino y San Antonio de la Cal, pertenecientes a la región de Valles Centrales de Oaxaca.
- Se reportó por primera vez en el estado la presencia de ZIKV en mosquitos *A. albopictus* en las localidades de Bajos de Chila y Puerto Escondido.
- Se reafirmó la presencia del DENV-1 circulando en las localidades de Puerto Escondido y Rio Grande pertenecientes a la región Costa de Oaxaca.
- Se demostró la cocirculación de DENV-1 y ZIKV en mosquitos *A. aegypti* de las localidades de Bajos de Chila y Puerto Escondido.

Referencias bibliográficas

- Weaver SC. Present and future arboviral threats. *Antiviral Research*. 2010;85: 328-45.
- Secretaría de Salud. Casos Confirmados de Enfermedad por Virus del Zika. [Base de Datos en Internet]. Mexico, D.F. SINAVE/DGE/SS. [Actualizada el 4 de Septiembre, 2017; consultada el 11 de Marzo 2018]. Disponible en : <https://www.gob.mx/salud/acciones-y-programas/direccion-general-de-epidemiologia-boletin-epidemiologico>
- Secretaría de Salud. "Casos Confirmados de Fiebre Chikungunya". [Base de Datos en Internet]. Mexico, D.F. SINAVE/DGE/SS. [Actualizada el 18 de Septiembre, 2017; consultada el 11 Marzo 2018]. Disponible en: <https://www.gob.mx/salud/acciones-y-programas/direccion-general-de-epidemiologia-boletin-epidemiologico>
- Secretaría de Salud. Panorama Epidemiológico de Dengue, boletín epidemiológico. [Base de Datos en Internet]. Mexico, D.F. SINAVE/DGE/SS. [Actualizada el 22 de Mayo, 2017; consultada en Marzo 2018]. Disponible en: <https://www.gob.mx/salud/acciones-y-programas/direccion-general-de-epidemiologia-boletin-epidemiologico>
- Thangamani S, Huang J, Hart EC, Guzman H, Robert B, Tesh HR. Vertical Transmission of Zika Virus in *Aedes aegypti* Mosquitoes. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2016; 95(5): 1169-173.
- Martínez-Fernández L, Torrado Y. Fiebre Chikungunya. *Revista Cubana de Medicina*. 2015; 54(1): 74-96.
- Galan-Huerta KA. Identificación y análisis de las variantes genómicas del virus Dengue y su asociación con la presentación clínica en una zona baja y otra de alta endemicidad en México. [Tesis de Maestría]. Nuevo Leon, Guanajuato. Universidad Autónoma de Nuevo Leon; 2013. 130 p
- Gorrochotegui-Escalante N, Gómez-Machorro C, Lozano-Fuentes S, Fernández-Salas I, Muñoz M, Farfán-Ale J, et al. Breeding structure of *aedes aegypti* populations in Mexico varies by region. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2002; 66(2): 213-22.
- Cisneros-Solano A, Díaz-Badillo A, Cruz-Martínez G, Tovar R, Ramírez-Palacios LR, Jiménez-Rojas F, et al. Dengue 2 genotypes in the state of Oaxaca, Mexico. *Arch Virol.* 2006;151; 113-25.
- Gardella-García CE, Pérez-Ramírez G, Navarrete-Espinoza J, Cisneros A, Jiménez-Rojas F, Ramírez-Palacios LR, et al. Specific genetic markers for detecting subtypes of Dengue virus serotype-2 in isolates from the states of Oaxaca and Veracruz, Mexico. *BMC Microbiology.* 2007; 8 (117): 1-16
- Pérez-Ramírez G, Díaz-Badillo A, Camacho-Nuez M, Cisneros A, Muñoz M. Multiple recombinants in two Dengue virus, serotype-2 isolates from patients from Oaxaca, Mexico. *BMC Microbiology.* 2009; 9(260): 1-12
- Bercholz-Urinowsky IJ, Monge J, Campos-Romero HF, Reyna-Figueroa J. Chikungunya fever as a trigger for systemic lupus erythematosus?. [Base de Datos en Internet]. España. Research Gate. 2017. [Consultado 25 de Marzo de 2018]. Disponible en: <https://www.researchgate.net/publication/319205822>
- Secretaría de Salud. Casos confirmados de Síndrome congénito asociado a Zika. [Base de Datos en Internet]. Mexico, D.F. SINAVE/DGE/SS. [Actualizada el 07 de Agosto, 2017; consultada el 15 Marzo 2018]. Disponible en: <https://www.gob.mx/salud/acciones-y-programas/direccion-general-de-epidemiologia-boletin-epidemiologico>
- Cisneros-Solano A, Moreno-Altamirano MMB, Martínez-Soriano U, Jiménez-Rojas F, Díaz-Badillo A, Muñoz ML. Sero-epidemiological and virological investigation of Dengue infection in Oaxaca, Mexico, during 2000-2001. *Dengue Bulletin.* 2004; 28: 28-34
- Günther J. Detección y Tipificación del Virus del Dengue en el vector *Ae. aegypti* y en pacientes de regiones endémicas de Oaxaca. [Tesis Doctoral]. Mexico, D.F; Instituto Politécnico Nacional. 2007. 99 p
- Armstrong PM, Rico-Hesse R. Efficiency of Dengue serotype 2 virus strains to infect and disseminate in *Aedes aegypti*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2003; 68(5): 539-44.
- Pech-May A, Moo-Llanes DA, Puerto-Avila MB, Casas M, Danis-Lozano R, Ponce G, et al. Population genetics and ecological niche of invasive *Aedes albopictus* in México. *Acta tropical.* 2016; 157: 30-41.
- Organización Mundial de la Salud/Organización Panamericana de la Salud. Dengue. Guías para el Diagnóstico, Tratamiento, Prevención y Control. La Paz. Bolivia. OMS/OPS; 2009.
- Center for Disease Control and Prevention. Laboratory Guidance and Diagnostic Testing.. Atlanta, GA. CDC; Agosto 2017. Consultada en Mayo 2018. Disponible en : <https://www.cdc.gov/dengue/clinlab/laboratory.html>
- Manorenjitha, M. The ecology and biology of *Aedes aegypti* (L.) and *Aedes albopictus* (Skuse) (Diptera: culicidae) and the resistance status of *Aedes albopictus* (FIELD STRAIN) against organophosphates in Penang, Malaysia. [Tesis de Maestría]. Malaysia; 2006. 44 p
- Johnson WB, Russell BJ, Lanciotti RS. Serotype-Specific Detection of Dengue Viruses in a Fourplex Real-Time Reverse Transcriptase PCR Assay. *J. Clin. Microbiol.* 2005; 43(10): 4977-83
- Lanciotti RS, Kosoy OL, Laven JJ, Pannella AJ, Velez JO, Lambert AJ, et al. Chikungunya Virus in US Travelers Returning from India, 2006. *Emerging Infectious Diseases.* 2007; 13(5): 764-67
- Lanciotti RS, Kosoy OL, Laven JJ, Velez JO, Lambert AJ, Campbell GL. Genetic and Serologic Properties of Zika Virus Associated with

- an Epidemic, Yap State, Micronesia, 2007. *Emerging Infectious Diseases*. 2008; 14(8): 1232-39 doi:10.3201/eid1408.080287.
24. Bennett KE, Olson KE, Muñoz M, Fernandez-Salas I, Farfan-Ale JA, Higgs S, et al. Variation in Vector Competence For Dengue Virus Among 24 collections of *Aedes aegypti* from Mexico and United States. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2002; 67(1): 85-92.
 25. Tsetsarkin KA. Adaptation of Chikungunya virus to *Aedes albopictus* mosquitoes : the role of mutation in the E1 and E2 glycoproteins. [Tesis de Doctorado]. Galveston, Texas; Universidad de Texas; 2009. 303 p
 26. Little E, Bajwa W, Shaman J. Local environmental and meteorological conditions influencing the invasive mosquito *Ae. albopictus* and arbovirus transmission risk in New York City. *PLOS Negl Trop Dis.* 2017; 11(8): 1-19
 27. Kuno, G., Mackenzie, J.S., Junglen, S., Hubálek, Z., Plyusnin, A y Gubler, D.J. (2017). Vertebrate Reservoirs of Arboviruses: Myth, Synonym of Amplifier, or Reality? *Viruses.* 2017;9 (185): 1-28
 28. Chang C, Ortiz K, Ansari A, Gershwin ME. The Zika outbreak of the 21st century. *Journal of Autoimmunity.* 2016; 1(13): 1-13
 29. Jamil Z, Waheed Y, Durrani TZ. Zika virus, a pathway to new challenges. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine.* 2016; 9(7): 626-29.
 30. Vouro R. Zika virus, vectors, reservoirs, amplifying hosts, and their potential to spread worldwide: what we know and what we should investigate urgently. *International Journal of Infectious Diseases.* 2016; 48: 85-90.
 31. Di Lucas M, Toma L, Severini F, Boccolini D, D'Avola S, Todaro D, et al. First record of the invasive mosquito species *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Diptera: Culicidae) on the southernmost Mediterranean islands of Italy and Europe. *Parasites & Vectors.* 2017; 10(543): 1-9
 32. Huerta H, González-Roldán JF, Sánchez-Tejeda G, Correa-Morales F, Romero-Contreras FE., Cárdenas-Flores R, et al. Detection of Zika in *Aedes* mosquitos from México. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2016. 1-4.
 33. Organización Panamericana de la Salud / Organización Mundial de la Salud. Actualización Epidemiológica. 5 de Mayo de 2016. [Consultada el 20 de Marzo 2018]. Washington, D.C; OPS/OMS. 2016. Disponible en: <https://www.paho.org/hq/dmdocuments/2016/2016-may-5-cha-actualizacion-epi-virus-zika.pdf>.
 34. Guzman MG, Vazquez S. The Complexity of Antibody-Dependent Enhancement of Dengue Virus Infection. *Viruses.* 2010; 2: 2649-2662.
 35. Paul LM, Carlin ER, Jenkins MM, Tan AL, Barcellona CM, Nicholson C, et al. Dengue virus antibodies enhance Zika virus infection. *Clinical and Translational Immunology.* 2016; 5(117):1-9
 36. Lednicky J, Beau De Rochars VM, El Badry M, Loeb J, Telisma T, Chavannes S, et al. Zika Virus Outbreak in Haiti in 2014: Molecular and Clinical Data. *PLOS Negl Trop Dis.* 2016; 10(4): 1-11
 37. Dupont-Rouzeyrol M, O'Connor O, Calvez E, Daures M, John M, Grangeon JP, et al. Coinfection with Zika and Dengue Viruses in 2 Patients, New Caledonia, 2014. *Emerging Infectious Diseases.* 2015; 21(2): 381-82.
 38. Rosso F, Pacheco R, Rodríguez S, Bautista D. Coinfección por virus del Dengue (DEN-V) y virus Chikungunya (CHIK-V) durante un brote epidémico en Cali, Colombia. Comunicación de un caso fatal. *Rev Chilena Infectol.* 2016; 33(4): 464-67.
 39. Chahar HS, Bharaj P, Dar L, Guleria R, Kabra S, Broor S. Co-infections with Dengue and Chikungunya virus in Delhi, India. *Emerging Infectious Diseases.* 2009; 15(7): 1077-80.
 40. Vazeille M, Mousson L, Martin E, Failloux A-B. Orally Co-Infected *Aedes albopictus* from La Reunion Island, Indian Ocean, Can Deliver Both Dengue and Chikungunya Infectious Viral Particles in Their Saliva. *PLOS Negl Trop Dis.* 2010; 4(6): 1-5
 41. Vega-Rúa A, Zouache K, Girod R, Failloux A-B, Lourenço-de-Oliveira R. High Level of Vector Competence of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* from Ten American Countries as a Crucial Factor in the Spread of Chikungunya Virus. *Journal of Virology.* 2014; 88(11): 6294-6306.
 42. Nuckols JT, Huang JS, Higgs S, Miller AL, Pyles RB, Pratt HM, et al. Evaluation of Simultaneous Transmission of Chikungunya Virus and Dengue Virus Type 2 in Infected *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae). *Journal Of Medical Entomology.* 2015; 52(3): 447-51.