

Co-circulación viral de Dengue y Chikungunya en mosquitos *Aedes aegypti* infectados naturalmente en Venezuela

Dengue and Chikungunya viral co-circulation in naturally infected Aedes aegypti mosquitoes in Venezuela

Martha E. Pernalet R.^{1,3}, Karem Flores², Narviz Pulido³, Daría Camacho^{1,3}, Luis Pérez-Ybarra¹ & Flor Herrera^{1,3*}

RESUMEN

Para detectar los arbovirus Dengue (DENV), Zika (ZIKV) y Chikungunya (CHIKV) en mosquitos *Aedes aegypti* (*Ae. aegypti*), se evaluaron dos municipios del estado Aragua, Francisco Linares Alcántara (FLA) y Mario Briceño Iragorry (MBI). Se capturaron 163 mosquitos en MBI y 105 en FLA con aspirador de espalda. Estos se agruparon (2-9 mosquitos) para la extracción de ARN y análisis mediante RT-PCR específica para cada virus. Se calcularon, Tasa Mínima de Infección (TMI) y Estimación de Máxima Verosimilitud (EMV). Los resultados evidenciaron co-infección de mosquitos por DENV-3 y CHIKV en FLA, y solo por CHIKV en MBI. Las TMI en MBI fueron para DENV (0%), CHIKV (0,61%), en FLA los valores para DENV y CHIKV, fueron 1,90% y 2,86%; respectivamente. Las EMV fueron en MBI igual a 0% para DENV y 0,63% para CHIKV, en FLA DENV (0,19%) y CHIKV (1,53%). Se comprobó la infección natural de *Ae. aegypti* con DENV y CHIKV, específicamente la co-circulación viral de DENV-3 y CHIKV en FLA, en MBI solo fue detectado CHIKV. La ausencia de detección de ZIKV probablemente se debió a interferencia viral. Los resultados indican la relevancia de incorporar a las prácticas convencionales de control vectorial, la detección específica de virus en zonas endemo-epidémicas durante todo el año, lo que favorecería las intervenciones y puesta en marcha de estrategias de control y prevención efectivas para limitar la permanente transmisión viral.

Palabras clave: Dengue, Chikungunya, Co-infección, *Aedes aegypti*, Venezuela

SUMMARY

To detect Dengue (DENV), Zika (ZIKV) and Chikungunya (CHIKV) in mosquitoes (*Ae. aegypti*) we evaluated two municipalities in Aragua State, Francisco Linares Alcántara (FLA) and Mario Briceño Iragorry (MBI). We captured 163 mosquitoes in MBI and 105 in FLA using Back Aspirator. The mosquitoes were grouped (2-9 mosquitoes per tube) for RNA extraction and typification by RT-PCR. We calculated Minimal Infection Rate (MIR) and Maximum Likelihood Estimation (MLE). The results showed co-infection by DENV-3 and CHIKV in FLA, and CHIKV in MBI. The MIR was to DENV 0% and 0.61% to CHIKV in MBI, while in FLA the values were 1.90% and 2.86% to DENV y CHIKV, respectively. The EMV were in MBI to DENV 0% and 0.63% to CHIKV, in the case of FLA DENV value was 0.19% and CHIKV 1.53%. We showed the natural infection of *Ae. aegypti* mosquitoes with DENV-3 and CHIKV in FLA and CHIKV in MBI. The absent of detection to ZIKV was probably due to viral interference. The results showed the relevance of incorporation of these techniques to conventional practices about vectorial control, specifically detection of viruses in endemic and epidemic regions during all year, because these practices could contribute to the effective interventions to control and prevention the viral transmission.

Keywords: Dengue, Chikungunya, Co-infection, *Aedes aegypti*, Venezuela

INTRODUCCIÓN

Los arbovirus son agentes virales transmitidos por mosquitos artrópodos (Westaway, 1985), están involucrados principalmente las especies

Aedes (Stegomyia) aegypti (Linnaeus, 1762) y *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Skuse, 1894). Entre los arbovirus que causan impacto en la salud pública se encuentran el virus Dengue (DENV), Chikungunya (CHIKV) y ZIKA (ZIKV), entre otros. Los DENV

¹ Universidad de Carabobo. La Morita, Estado Aragua - Venezuela

² Ministerio del Poder Popular para la Salud. Dirección General de Salud Ambiental. Maracay, Estado Aragua - Venezuela

³ Instituto de Investigaciones Biomédicas "Dr. Francisco J. Triana Alonso". Maracay, Estado Aragua - Venezuela

ORCID: 0000-0001-7757-7420 / 0000-0003-1899-9564 / 0000-0001-7785-6497 / 0000-0002-4475-060x / 0000-0003-0793-7953 / 0000-0001-7785-6497

* Autor de correspondencia: flormhq@gmail.com

y ZIKV son flavivirus, pertenecientes a la familia Flaviviridae, mientras que el CHIKV es un alfavirus de la familia Togaviridae. El DENV es causa de enfermedad de curso agudo y sistémico que afecta considerablemente a los humanos en términos de morbilidad y mortalidad, lo que constituye un grave problema de salud pública en América Latina, por ser una de las enfermedades infecciosas re-emergentes de mayor expansión en la región (Pozo-Aguilar *et al.*, 2014, Ramos-Castañeda *et al.*, 2017). En la región de las Américas, los casos por DENV han aumentado, en 2018 se notificaron 446.150 casos de dengue (2.164 clasificados como dengue grave). En comparación con los años previos, el número total de casos registrados al cierre de 2017 (581.207) fue inferior al de 2016 (2.178.929) y el más bajo en los últimos 10 años. Sin embargo, la proporción de casos de dengue grave reportados en 2017 es superior a la de los dos años anteriores (OPS/OMS, 2018). En Venezuela, el comportamiento del dengue ha sido endemo-epidémico, con brotes cada 3-5 años (Dick *et al.*, 2012). De forma particular, en el país entre las SE 1 y SE 44 de 2018, fueron notificados 14.166 casos probables de dengue, de los cuales 1.871 fueron confirmados y 77 (0,5%) clasificados como dengue grave, lo que demuestra un incremento respecto a lo reportado en el mismo periodo en 2016 y 2017 (OPS/OMS, 2018). En el estado Aragua, se ha reportado la circulación simultánea de los cuatro serotipos de DENV (Barrera *et al.*, 2002; Camacho *et al.*, 2003; Comachet *et al.*, 2001; Espino *et al.*, 2010; Rodríguez *et al.*, 2007; Rodríguez-Roche *et al.*, 2012; Rubio-Palis *et al.*, 2011; Urdaneta *et al.*, 2005), lo que describe una situación de hiperendemicidad (Gubler, 1998).

La fiebre por Chikungunya es una enfermedad emergente en las Américas, causada por el CHIKV, que es transmitida a los humanos por las mismas especies de mosquitos involucradas en la transmisión del DENV (OPS, 2011, Palacios-Martínez *et al.*, 2015) que ha causado desde el 2004 grandes epidemias en Asia y desde el 2013 en las Américas, las cuales han provocado considerable morbilidad y sufrimiento a los afectados (OPS, 2011). En Venezuela, hay reporte de casos confirmados hasta el año 2017, con una distribución de casos acumulados de 2303, 352, 68 y 39 en los años 2014, 2015, 2016 y 2017 respectivamente (OPS/OMS, 2017). De forma específica solo hay

un reporte de detección molecular de CHIKV en el estado Aragua (Camacho *et al.*, 2017).

En el caso de ZIKV, el primer caso autóctono se reportó en el Estado Bolívar durante la semana 48 en 2015 (PAHO/WHO, 2017). El impacto de la enfermedad que causa es de especial interés debido a que afecta a cualquier grupo etario, pero puede producir malformaciones neurológicas como microcefalia, en fetos y neonatos de madres infectadas (Oliveira Melo *et al.*, 2016; Oehler *et al.*, 2014). Desde la emergencia del ZIKV, se detectaron casos sospechosos en el país, con una incidencia superior en los estados Falcón, Sucre y Amazonas, mientras que en 2016 las zonas con mayor número de casos fueron Distrito Capital, Sucre y Delta Amacuro (PAHO/WHO, 2017).

Estas enfermedades virales causan en el ser humano manifestaciones clínicas similares (OPS, 2011; Palacios-Martínez *et al.*, 2015) que deben ser diferenciadas entre sí, para dar un adecuado tratamiento y soporte a los pacientes. Aunque ya hay una vacuna aprobada contra el dengue (OMS, 2020) el control de la enfermedad en nuestro país se sigue basando, fundamentalmente, en el control del vector durante los brotes o epidemias (López *et al.*, 2016; Molina de Fernández *et al.*, 2013). Esto se debe a que dicha vacuna hay que aplicarla sólo a las personas que ya tienen anticuerpos contra algunos de los serotipos del dengue porque de no ser así las personas pueden sufrir un dengue muy grave. Asimismo, en las condiciones económicas de nuestro país, es muy difícil que pueda sufragar estos gastos. Si aunado al control, se identifican oportunamente los arbovirus que infectan naturalmente a los mosquitos, podría establecerse el riesgo de transmisión en zonas endemo-epidémicas, como el estado Aragua. Esto proporcionaría un aporte valioso a los sistemas de vigilancia del país, para actuar con mayor precisión en el diseño e implementación de las medidas de control, adaptadas a la situación real de cada región (Pérez-Pérez *et al.*, 2017). En este trabajo se realizó la detección de los patógenos DENV, CHIKV y ZIKV en mosquitos adultos *Ae. aegypti* capturados dentro de viviendas de los municipios Francisco Linares Alcántara (FLA) y Mario Briceño Iragorry (MBI) del Estado Aragua, lo que permitió establecer la circulación arboviral en estas comunidades.

MATERIALES Y MÉTODOS

Zona de captura

Este estudio se realizó en el Estado Aragua, ubicado al centro norte de Venezuela en una meseta de la cordillera de La Costa a 436 m sobre el nivel del mar. El clima es marcadamente estacional, con períodos alternos de lluvia y sequía con temperatura media de 25,5°C y precipitación media anual de 843 mm. Comunidades de los municipios Francisco Linares Alcántara y del municipio Mario Briceño Iragorry se seleccionaron para captura de mosquitos por presentar casos de dengue.

Captura de mosquitos

Para las capturas de mosquitos en los que se realizó la detección viral, se seleccionaron al azar 20 conglomerados por municipio, los cuales fueron codificados y numerados. Dentro de cada conglomerado seleccionado se tomó una muestra de 10 viviendas por conglomerado, evaluándose 10 viviendas por día. El total de viviendas evaluadas fue 200 para el municipio MBI y 200 para municipio FLA. La selección de la primera casa dentro de cada conglomerado se hizo aleatoriamente y a partir de esta, se realizó la búsqueda activa de mosquitos adultos en las zonas intra y peridomiciliarias por muestreo sistemático 1/3, es decir, se inspeccionaba la primera vivienda y luego cada tres, hasta completar las 10 viviendas necesarias. Las capturas de mosquitos adultos dentro de las viviendas se realizaron con aspirador de espalda (Aspirador Modelo 1412 John Whock Com.®) modificado e impulsado por una batería de 12 V), metódicamente de derecha a izquierda en dormitorios, armarios y cualquier lugar oscuro. La duración de aspiración en cada ambiente fue de 3 min. En viviendas con más de una habitación, se aspiró en dos o tres espacios dependiendo del tamaño de la vivienda (DOF, 2011). Las capturas fueron realizadas desde Diciembre 2016 hasta Febrero 2017, que corresponde al período de sequía en Venezuela.

Procesamiento e identificación de los mosquitos capturados

El material biológico capturado, fue preparado en el Laboratorio de Control de Vectores del Ministerio del Poder Popular para la Salud

(MPPS) para ser observado mediante microscopía óptica mediante ocular 10X y objetivo 40X. La información que se derivó de la actividad de captura de los ejemplares adultos vivos fue recopilada en un formato especialmente diseñado para tal fin. Todos los ejemplares capturados se identificaron a nivel de especie utilizando claves taxonómicas (Covaet *al.*, 1966; Cova *et al.*, 1977; Rueda, 2004). Los mosquitos *Aedes* identificados se preservaron por especie en microviales Eppendorf® debidamente rotulados (con la información de municipio, sector, conglomerado, vivienda, fecha de captura) a una temperatura de - 20° C.

Extracción de Ácido Ribonucleico (ARN)

Los mosquitos fueron trasladados al Instituto de Investigaciones *Biomédicas* “Dr. Francisco J. Triana-Alonso” (BIOMED-UC) en donde se llevaron a cabo los ensayos para la extracción del ARN total en grupos que contenían de 2-9 mosquitos por tubo de reacción. La técnica de extracción utilizada fue el método de Fenol-Cloroformo, con el reactivo TRIZOLR LS Reagent (Invitrogen, Carisbad California; United States of America [USA]), siguiendo las recomendaciones del fabricante. Finalmente, el ARN extraído se resuspendió en 30 µL de tampón TE (10:1) y se almacenó a -70°C hasta su uso.

Transcriptasa Reversa acoplada a Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT-PCR, Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction)

Las condiciones de reacción de RT-PCR fueron similares para todos los virus (DENV, CHIKV y ZIKV), debido a que se empleó un kit comercial Access RT-PCR System (Promega, Madison Wisconsin; USA). Se agregaron 2,5 µL de la muestra de ARN extraído de los mosquitos en un volumen final de 25 µL de mezcla de reacción que contenía Taq Polimerasa (0,1 U/µL), Transcriptasa Reversa (0,1 U/µL), dNTP (2mM), MgSO4 (1mM), cebadores específicos según especie viral (0,25 pmoles). La segunda reacción específica para DENV se realizó siguiendo el protocolo de Lanciotti *et al.*, (1992). Específicamente, el producto de la primera reacción donde se obtiene un producto de 511 pb común para los cuatro serotipos virales fue diluido (1:100) y 2,5 µL fueron sometidos a reacción de amplificación mediante una PCR semianidada para observar bandas

de diferentes tamaños según el serotipo viral (482 pb DENV-1, 119 pb DENV-2, 290 pb DENV-3 y 392pb DENV-4).

La detección de ZIKV se realizó utilizando los cebadores reportados por Balm *et al.* (2012), que reconocen una región que codifica la proteína no estructural NS5 del genoma viral, dando como resultado la amplificación de un producto de 192 pb.

Para la determinación de CHIKV, se usaron cebadores que codifican para una región del gen de la proteína E1 del CHIKV, que amplifica una secuencia de 555 pb (Niyaset *al.*, 2010).

En cada reacción de RT-PCR se incluyeron controles positivos y negativos para asegurar la veracidad de los resultados. Los controles positivos para DENV, fueron sobrenadantes de cultivo de cada serotipo (DENV-1, DENV-2, DENV-3, DENV-4) que se usaron de forma aleatoria en cada ensayo. En el caso de CHIKV el control positivo utilizado fue el genotipo ECSA (East Central South África), cepa DRC 1721 y para ZIKV el genotipo africano (MR766). De igual forma se usaron dos controles negativos, el primero incluido desde la extracción deARN, que consistió en de un mosquito *Ae. aegypti* macho y el segundo control para la PCR que fue un tubo con todos los componentes de la mezcla de reacción, sin ARN.

Las reacciones de amplificación (RT-PCR y PCR sencilla) se realizaron en un termociclador (MJ Research, PTC-200, Watertown Massachusetts; USA). Para evidenciar los productos amplificados se hicieron electroforesis en gel de agarosa al 2% empleando SYBR Green, la visualización se realizó en un equipo de fotodocumentación molecular, Gel Doc XR+ (BIO-RAD, Universal Hood II; USA).

Análisis estadístico

Se calculó la Tasa Mínima de Infección (TMI) (MIR: Minimum Infection Rate) y la Estimación de Máxima Verosimilitud (EMV) (MLE: (Maximum Likelihood Estimation) para estimar la proporción de mosquitos infectados, con uno o más virus, en cada municipio.

TMI se refiere a la tasa de infección y se asume que un grupo positivo para un determinado virus consiste de un solo mosquito infectado, por lo cual refleja el límite inferior de la verdadera infección y desestima múltiples infecciones (Bustamante & Lord, 2010).

Se calcula de acuerdo a la siguiente fórmula: $(N^{\circ} \text{ grupos positivos} / \text{Total } N^{\circ} \text{ mosquitos ensayados}) \times 1000$.

EMV estima la tasa de infección con mayor exactitud que TMI pero el tamaño de muestra debe ser muy similar y menor a 1000 (Guet *al.*, 2014). El tamaño del grupo de mosquitos usado fue un promedio de todos los tamaños de los grupos.

Su fórmula es: $[1 - (1 - Y/X)^{1/m}] \times 1000$, donde Y= N° grupos positivos; X = N° total de grupos; m= tamaño del grupo

RESULTADOS

Se procesaron 268 mosquitos distribuidos en 163 provenientes del municipio MBI y 105 de FLA. El porcentaje de positividad para Arbovirus fue superior para FLA, a pesar de que el número de *Ae. aegypti* capturados y procesados fue menor en este municipio (Tabla I).

Tabla I. Frecuencia de la positividad a Arbovirus por análisis molecular (RT-PCR) de mosquitos del género *Aedes*, en los Municipios Mario Briceño Iragorry (MBI) y Francisco Linares Alcántara (FLA), del estado Aragua.

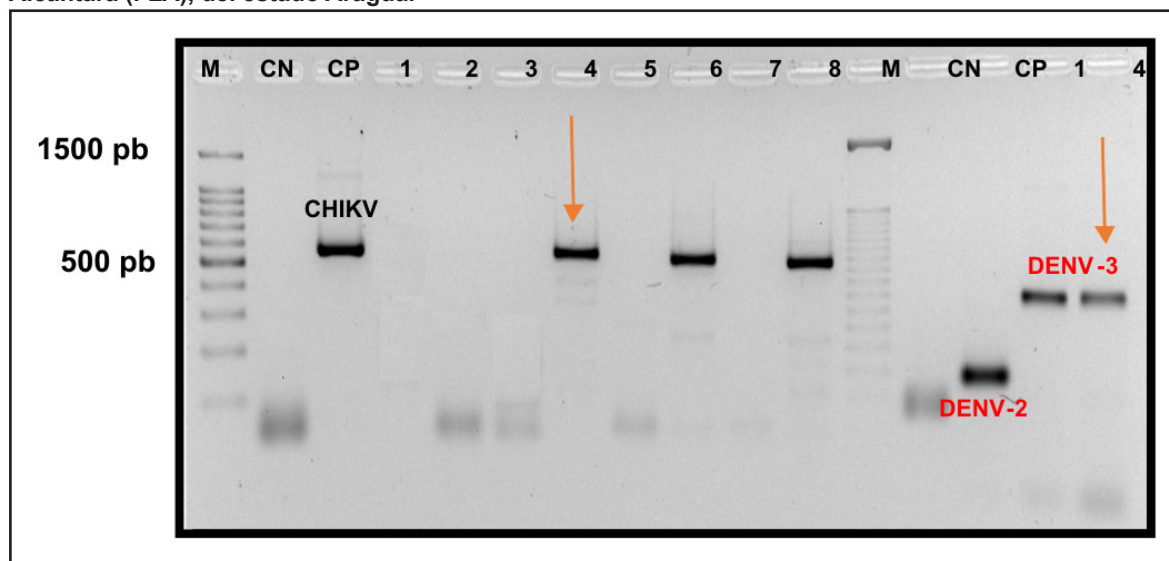
Municipio	Mosquitos capturados (%)	Grupos procesados (%)	Grupos Positivos (%)
MBI	163 (60,8)	46 (60,5)	1 (2,2)
FLA	105 (39,2)	30 (39,5)	4 (13,3)
Total	268 (100)	76 (100)	5 (6,7)

Porcentaje de mosquitos capturados: Mosquitos capturados en cada municipio entre el total de los mismos.

Porcentaje de grupos procesados: Grupos de mosquitos Procesados en cada municipio entre el total de los mismos.

Porcentaje de grupos positivos: Grupos de mosquitos positivos entre los grupos procesados de cada municipio.

Fig. 1. Electroforesis en gel de agarosa al 2% de los fragmentos genómicos amplificados por RT-PCR, de grupos de mosquitos capturados en los Municipios Mario Briceño Iragorry (MBI) y Francisco Linares Alcántara (FLA), del estado Aragua.



El análisis empleando metodologías moleculares (RT-PCR) evidenció la presencia de bandas correspondientes a los tamaños moleculares esperados (Fig. 1) en determinados grupos de mosquitos. Específicamente, en el municipio FLA se identificó la presencia del serotipo DENV-3 en los conglomerados G-8 y C-16. Así como, CHIKV en los conglomerados C-16, E-14 y E-11.

Las zonas de FLA con grupos de *Ae. aegypti* positivos fueron específicamente los sectores Francisco de Miranda, La Morita II, José Antonio Páez y El Oasis. En relación al municipio MBI, solo se observó positividad para CHIKV en el conglomerado J-7, correspondiente al sector 3 de

Caña de Azúcar (Tabla II). En ninguno de los grupos de mosquitos capturados en ambos municipios se observó positividad para ZIKV.

En la Fig. 2, se observa la distribución espacial de las zonas de los municipios, donde fue posible identificar los DENV y CHIKV, destaca la co-circulación viral del serotipo DENV-3 y CHIKV en la localidad de la Morita II (C-16) del municipio FLA y la presencia de ambos virus en algunos de sus sectores, en el caso del municipio MBI se evidencia la ubicación espacial de los mosquitos positivos a DENV.

En relación a los parámetros TMI y EMV, se observa que la TMI es superior en el municipio FLA

Tabla II. Zonas de los Municipios Mario Briceño Iragorry (MBI) y Francisco Linares Alcántara (FLA), del estado Aragua con grupos de mosquitos positivos para DENV y CHIKV, capturados en el período diciembre 2016-febrero 2017.

Municipio	Zona	DENV		
		Conglomerado	(Serotipo)	CHIKV
MBI	Caña de Azúcar III	J-7		Positivo
	Francisco de Miranda	G-8	DENV-3	
FLA	La Morita II	C-16	DENV-3	Positivo
	José Antonio Páez	E-14		Positivo
	El Oasis	E-11		Positivo

*Los análisis se realizaron por grupos de mosquitos, que contenían en promedio 3,5 mosquitos hembras por tubo de reacción, todos pertenecientes a un mismo conglomerado (unidades geográficas de análisis).

Fig. 2. Ubicación geográfica en cada municipio (MBI y FLA) evaluado de los grupos de mosquitos *Ae. aegypti* positivos para los DENV y CHIKV, durante el período diciembre 2016 hasta febrero 2017.



Tabla III. Tasa Mínima de infección (TMI) en % para los virus Dengue y Chikungunya.

Municipio	Mosquitos Capturados	Grupos	Grupos + DENV	TMI* DENV	Grupos + CHIKV	TMI* CHIKV	TMI* DENV + CHIKV
MBI	163	46	0	0,00	1	0,61	-
FLA	105	30	2	1,90	3	2,86	4,76
Ambos	268	76	2	0,75	4	1,49	2,24

Tabla IV. Estimación de Máxima Verosimilitud (EMV) en % para los virus Dengue y Chikungunya.

Municipio	Mosquitos Capturados	Grupos	Grupos + Dengue	EMV DENV	Grupos + CHIKV	EMV CHIKV	EMV DENV y CHIKV
MBI	163	46	0	0,00	1	0,63	-
FLA	105	30	2	0,19	3	2,97	5,08
MBI y FLA	268	76	2	0,76	4	1,53	2,32

El tamaño de muestra utilizado en el cálculo, correspondió al tamaño promedio de los grupos utilizados, $m=3,5$.

para DENV y CHIKV (Tabla III), cuando se calcula de forma individual y cuando se consideran los datos obtenidos para cada virus. En el caso de la EMV, empleando un tamaño de muestra promedio de grupos ($n=3,5$) se evidencia igualmente que este parámetro es superior en el municipio FLA si se compara con MBI, destaca el valor obtenido para CHIKV (Tabla IV).

DISCUSIÓN

En este estudio, se evidenció la infección natural de *Ae. aegypti* con los virus DENV y CHIKV, en el municipio FLA específicamente la circulación viral de DENV-3 y CHIKV, mientras que en el municipio MBI se encontró solo CHIKV.

En el municipio FLA la TMI para DENV 1,9% la cual fue similar a la reportada previamente en 2005 por Urdaneta *et al.* en Maracay con un valor de 1,7% cuando predominó también el serotipo DENV-3, lo que sugiere el mantenimiento en el tiempo de la TMI de este serotipo viral.

Este municipio se encuentra ubicado en el centro norte del estado Aragua, tiene una superficie de 23,8 Km², lo que representa un 0,33% del total del estado Aragua cuya extensión es de 7.014 Km². Presenta una temperatura media de 24,5°C, con una precipitación promedio de 924 mm anual, está emplazado en la cuenca hidrográfica del Lago de Valencia y es el municipio con la mayor densidad poblacional de Venezuela. Para el año 2011 su población era de 169.158 habitantes (Instituto Nacional de Estadística, 2011). La capital es la ciudad de Santa Rita, donde se encuentra ubicada La Morita II (conglomerado C-16) donde se evidenció la circulación viral de DENV-3 y CHIKV. Este municipio es uno de los más desatendidos del estado Aragua y los servicios son más deficientes. Esto origina, por ejemplo, que el almacenamiento de agua en recipientes en las viviendas sea común, lo cual produce mayor número de hábitats para los vectores. Por lo tanto, como indica Rubio-Palis *et al.* (2017) deben dirigirse los esfuerzos para el control y/o eliminación de criaderos en localidades sin suministro de agua potable por tubería y con fallas en el suministro de agua, ya que son las que presentan mayores índices aélicos, incluyendo mayor número de pupas por recipientes positivos, y de acuerdo a estos resultados, también presenta mosquitos adultos

de *Ae. aegypti* naturalmente infectados con para DENV y CHIKV, lo que evidencia la gravedad de la situación.

En cuanto al Municipio MBI, no se observaron grupos positivos para DENV (TMI 0,0%), al igual que en el año 2005 (Urdaneta *et al.*). Este municipio se encuentra ubicado al norte del estado Aragua, siendo su capital es El Limón. La superficie del municipio es de 54 Km² y para el año 2011 tenía una población de 171.574 habitantes, lo cual representa el 0,76% del total del estado Aragua. La temperatura media del municipio es de 24,6°C. y presenta una precipitación en promedio de 901 mm al año (Instituto Nacional de Estadística, 2011). Gran parte del municipio MBI está conformado por barrios consolidados en los cuales los servicios de agua potable y de recolección de desechos sólidos pudieran funcionar mejor que en FLA.

Por otra parte, la TMI y EMV para CHIKV, fue de 0,6 % en el municipio MBI, un valor mayor que 0,1% el cual se considera un indicador potencial de brote (Gu *et al.*, 2008). En FLA, la TMI fue 2,86 % y el EMV 2,97%, valores cerca de 30 veces más elevados que 0,1% lo cual significa que la transmisión del virus es más alta en este municipio que en MBI. En un estudio realizado en ciudades ecuatorianas con epidemias de CHIKV se reportó un valor similar al de FLA con un TMI de 2,3% y un EMV de 3,3% (Cevallos *et al.*, 2018). Si se considera que el CHIKV se introdujo en las Américas en el 2013 y desde entonces, particularmente en el trópico, se ha dispersado muy rápido, se podría sugerir que la transmisión del CHIKV pudo tener el mismo origen y dispersión tanto en Ecuador como en Venezuela, sin embargo los resultados sugieren la necesidad de realizar un estudio más detallado para determinar si esta posibilidad es cierta.

Un aspecto importante a considerar es si dos virus pueden infectar a un mismo mosquito, lo cual determinaría si se presenta interferencia de un virus con respecto al otro en el vector. Se ha reportado que la interferencia viral es un fenómeno en el cual la infección por un virus (primaria) a un determinado organismo, inhibe la infección (secundaria) por otro virus. La interferencia puede ser homóloga, la cual se presenta entre virus de una misma familia y la interferencia viral heteróloga, que describe una interacción negativa entre virus de diferentes

familias (Salas-Benito y De Nova-Ocampo, 2015). En algunos casos esta infección simultánea, no resulta en interferencia viral y ambos agentes infecciosos pueden coexistir en la misma célula. Este fenómeno se llama “acomodación viral”. Se ha reportado que infecciones simultáneas de DENV y CHIKV presentan o no interferencia viral heteróloga; estos resultados contradictorios pueden deberse a diferencias en las cepas de virus evaluadas (Salas-Benito y De Nova-Ocampo, 2015). En este estudio no es posible determinar la presencia en un mismo mosquito de ambos virus porque se trabajó con grupos de insectos. Sin embargo, debido a los altos índices de infección encontrados para DENV y CHIKV, se pudiera considerar la posibilidad de la ausencia de ZIKV en las muestras analizadas, por interferencia viral bien sea homóloga o heteróloga.

La transmisión de estas enfermedades depende de interacciones entre los virus, los mosquitos y las personas. Tales interacciones son influenciadas por factores abióticos (temperatura, lluvia y humedad) y bióticos (abundancia de personas y mosquitos vectores). Variaciones de estos factores en un área determinada pueden resultar en cambios profundos en la transmisión (Komar, 2001). Los resultados de este trabajo indican que las condiciones bióticas y abióticas se cumplen en ambos municipios aunque la transmisión es mucho más eficiente en FLA. Esta situación podría agravarse ya que el estudio fue realizado durante la época de sequía (diciembre 2016-febrero 2017) y es sabido que la densidad poblacional aumenta con las lluvias. Probablemente, la mayoría de la población ya haya sufrido infecciones y se podría esperar que los brotes continúen en poblaciones susceptibles como los niños. Otro factor que agravaría esta situación es el mantenimiento del virus en mosquitos, a través de la transmisión vertical o transovárica (Joshi *et al.*, 2002, Pérez-Pérez *et al.*, 2017) por lo cual sería importante estudiarla en estos municipios.

La circulación simultánea de los arbovirus DENV y CHIKV en un mismo sector de la población, podría ocasionar mayores complicaciones de salud para las personas en riesgo a padecer estas enfermedades virales. En este sentido Donalisio *et al.* (2017) señalan que la co-circulación viral podría resultar en una viremia más intensa u otras alteraciones inmunológicas que influirían directamente en la morbilidad y la mortalidad de tales enfermedades.

Esta situación tendría implicaciones negativas para los servicios de salud, principalmente debido a la ausencia de tratamiento, vacuna disponible en nuestro país, prevención efectiva y medidas de control apropiadas.

La detección molecular de los arbovirus DENV, CHIKV y ZIKV y cualquier otro transmitido por vectores del género *Aedes* junto a las estrategias convencionalmente empleadas para el control vectorial, deberían ser aplicadas no solamente en períodos de brote o epidemia, si no durante todo el año. Esta estrategia podría ayudar a las autoridades de salud a conocer de forma específica el/los agente/s patógeno/s circulante/s y así intervenir efectivamente para reducir el riesgo de transmisión y dispersión descontrolada de estos virus, que tanto afectan a los habitantes de las zonas donde logran introducirse.

AGRADECIMIENTOS

A los habitantes de los municipios, Francisco Linares Alcántara y Mario Briceño Iragorry por abrir las puertas de sus hogares y colaborar activamente en el estudio. Asimismo, a los inspectores sanitarios Jesús González, Julio González, Matilde Quintero y Oswaldo Salas por su experiencia y apoyo en las inspecciones y captura de mosquitos y al Ingeniero Ricardo Corneles por el desarrollo del mapa del Georeferencial.

FINANCIAMIENTO

Este estudio forma parte del Proyecto Binacional de Liderazgo Municipal Intersectorial en Salud financiado por la IDRC- Canadá a través de la Fundación Santa Fé de Bogotá, Colombia y el Instituto de Investigaciones LACSO, Venezuela. Fue coordinado por la Unidad de Investigación y Estudios en Salud Pública de la Universidad de Carabobo en los municipios Francisco Linares Alcántara y Mario Briceño Iragorry del estado Aragua. Acuerdo de subvención N° 107843-001.

REFERENCIAS

- Balm M., Lee Ch., Lee H., Chiu L., Koay E. & Tang J. (2012). A Diagnostic Polymerase Chain Reaction Assay for Zika Virus. *J. Med. Virol.* **84**:1501-1505.
- Barrera R., Delgado N., Jiménez M., Villalobos I. & Romero I. (2000). Estratificación de una ciudad

- hiperendémica en dengue hemorrágico. *Rev. Panam. Salud Pública.* **8**: 225-233.
- Barrera R., Delgado N., Jiménez M. & Valero S. (2002). Factores eco-epidemiológicos asociados con la fiebre de dengue hemorrágico hiperendémico en la ciudad de Maracay, Venezuela. *Boletín de Dengue.* **26**: 84-95.
- Bustamante D., & Lord C. (2010). Sources of error in the estimation of mosquito infection rates used to assess risk of arbovirus transmission. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **82**: 1172-1184.
- Camacho D. E., Álvarez M., Rodríguez-Henríquez F., de Quintana M., Soler M., Chiarello A., *et al.* (2003). Diagnóstico de laboratorio de infecciones por el virus dengue en el estado Aragua, Venezuela: Octubre 1997-Diciembre 1998. *Invest. Clin.* **44**: 91-103.
- Camacho García, D., Celis A., Moros Z., Reyes J., Araujo R., Alcántara A., *et al.* (2016). Circulación de virus Chikungunya en el estado Aragua (Venezuela) durante el año 2014. *Bol. Malariol. San. Amb.* **56**: 122-130. Disponible en: http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1690-46482016000200003&lng=es&tlng=es [Consulta 10 de abril de 2020]
- Cevallos V., Ponce P., Waggoner J., Pinsky B., Coloma J., Quiroga C., *et al.* (2018). Zika and Chikungunya virus detection in naturally infected *Aedes aegypti* in Ecuador. *Acta. Trop.* **177**: 74-80.
- Comach G., Álvarez M., Camacho D., Chiarello A., de Quintana M., Soler M., *et al.* (2001). Utilidad de la transcripción reversa-reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) para la vigilancia preventiva y el diagnóstico clínico del dengue. *Bol. Malariol. San. Amb.*; **41**: 27-33.
- Cova P., Sutil E. & Rausseo J.A. (1966). *Mosquitos de Venezuela*. Tomo 1. Publicaciones Ministerio de Sanidad y Asistencia Social. Caracas. Venezuela 246.
- Cova P. & Sutil E. (1977). *Claves gráficas para la clasificación de Culicidae de Venezuela*. Dirección de Malariología y Saneamiento Ambiental. Ministerio de Sanidad y Asistencia Social.
- Diario Oficial de la Federación. (2011). *Norma Oficial Mexicana NOM-032-SSA2-2010, para la vigilancia epidemiológica, prevención y control de las enfermedades transmitidas por vector*. [Documento en línea]. Disponible: http://www.cenaprece.salud.gob.mx/programas/interior/vectores/descargas/pdf/nom_032_ssa2_2010_norma_petv.pdf [Consulta: Febrero 12, 2016].
- Dick O. B., San Martín J. L., Montoya R. H., Del Diego J., Zambrano B. & Dayan G. H. (2012). Review: The history of dengue outbreaks in the Americas. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **87**: 584-593.
- Donalisioi M. R., Ribas Freitas A. R. & Von Zuben A. P. (2017). Arboviruses emerging in Brazil: challenges for clinic and implications for public Health. *Rev. Saúde Pública*; **51**: 30.
- Espino C., Comach G., Sierra G., Guzmán D., Camacho D., Cabello de Quintana M., *et al.* (2010). Incidencia de infecciones sintomáticas y asintomáticas por virus dengue en Maracay, Venezuela: 2006-2007. *Bol. Mal. Salud Amb.* **50**: 65-74.
- Gu W., Lampman R. & Novak R. (2014). Problems in estimating mosquito infection rates using Minimum Infection Rate. *J. Medical Entomol.* **40**: 595-596.
- Gu W., Unnascha T., Katholich Ch., Lampman R. & Novak R. (2008). Fundamental issues in mosquito surveillance for arboviral transmission. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*; **102**: 817-822.
- Gubler D. J. (1998). Dengue and dengue hemorrhagic fever. *Clin. Microbiol. Rev.* **11**: 480-496.
- Instituto Nacional de Estadística (INE). Informe Geoambiental 2011. [Documento en línea] Disponible: http://www.ine.gob.ve/documentos/Ambiental/PrincIndicadores-/pdf/Informe_Geoambiental_Aragua.pdf. [Consulta: Julio 20, 2020]
- 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. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **67**: 158-161.

- Komar N. (2001). West Nile virus surveillance using sentinel birds. *Ann. NY Acad. Sci.*; **951**: 58–73.
- Lanciotti R. S., Calisher Ch. H., Gubler D. J., Chang G. & Vorndam V. (1992). Rapid detection and typing of dengue viruses from clinical samples by using Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction. *J. Clin. Microbiol.* **30**:545-551.
- López M., Viroga S., Ramos C., Amigo C., Speranza & N. (2016). *Eficacia y seguridad de repelentes de mosquitos para uso humano disponibles en Uruguay*. [Documento en línea]. Disponible: http://www.farmacologia.hc.edu.uy/images/Informe_repelentes.pdf [Consulta: Noviembre 16, 2016].
- Molina de Fernández D., Bastidas D. M. & Figueroa L. E. (2013). Malation vs. *Aedes aegypti* (Linnaeus) (Diptera: Culicidae) de diferentes regiones de Venezuela. *Bol. Mal. Salud Amb.* **53**: 46-55.
- Niyas K. P., Abraham R., Unnikrishnan R. N., Mathew Th., Nair S., Manakkadan A., et al. (2010). Molecular characterization of Chikungunya virus isolates from clinical samples and adult *Aedes albopictus* mosquitoes emerged from larvae from Kerala. South India. *Virol. J.* **7**: 189.
- Oehler E., Watrin L., Larre P., Leparc-Goffart I., Lestere S., Valour F., et al. (2014). Zika virus infection complicated by Guillain-Barre syndrome – case report, French Polynesia, December 2013. *Euro Surveill.* **19**: 20720.
- Oliveira Melo A. S., Malinger G., Ximenes R., Szejnfeld P. O., Alves Sampaio S. & Bispo de Filippis A. M. (2016). Zika virus intrauterine infection causes fetal brain abnormality and microcephaly: Tip of the iceberg? *Ultrasound. Obstet. Gynecol.* **47**: 6–7.
- OMS (2020). *Preguntas y respuestas sobre las vacunas contra el dengue*. [Documento en línea]. Disponible: https://www.who.int/immunization/research/development/dengue_q_and_a/es/ [Consulta: Julio 18, 2020]
- OMS (2017). *Chikungunya*. [Documento en línea]. Disponible: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/chikungunya> [Consulta: Julio 18, 2020]
- OPS/OMS (2018). *Actualización Epidemiológica: Dengue*. 21 de noviembre de 2018, Washington, D.C. OPS/OMS.
- OPS/OMS (2017). *Chikungunya: Datos, mapas y estadísticas*. [Documento en línea]. Disponible: https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_topics&view=rdmore&cid=5932&item=chikungunya&type=statistics&Itemid=40931&lang=es. [Consulta: Diciembre 12, 2017].
- OPS [Internet]. Preparación y respuesta ante la eventual introducción del virus Chikungunya en las Américas; 2011. [Documento en línea]. Disponible: http://www1.paho.org/hq/dmdocuments/CHIKV_Spanish.pdf [Consulta: Marzo 01, 2019].
- OPS (2017). *Estrategia de Gestión Integrada para la prevención y control del dengue en la Región de las Américas*. Washington, D.C.: OPS.
- PAHO/WHO(2017). *Venezuela-Zika Epidemiological Report. September 2017*. Washington, D.C. [Documento en línea]. Disponible: <https://www.paho.org/hq/dmdocuments/2017/2017-phe-zika-situation-report-ven.pdf> [Consulta: Marzo 14, 2019].
- Palacios-Martínez D., Díaz-Alonso R. A., Arcesequera L. J. & Díaz-Vera E. (2015). Chikungunya, una enfermedad vírica emergente. Propuesta de un algoritmo de manejo clínico. *Semergen.* **41**: 221-225.
- PAHO (1994). *Dengue and dengue hemorrhagic fever in the Americas: guidelines for prevention and control*. Washington, D.C.: PAHO. (Scientific Publication No. 548).
- Pérez-Pérez J., Sanabria W. H., Restrepo C., Rojo R., Henao E., Triana O., et al. (2017). Vigilancia virológica de *Aedes (Stegomyia) aegypti* y *Aedes (Stegomyia) albopictus* como apoyo para la adopción de decisiones en el control del dengue en Medellín. *Biomédica.* **37**: 155-66.
- Pozo-Aguilar J. O., Monroy-Martínez V., Díaz D., Barrios-Palacios J., Ramos C., Ulloa-García A., et al. (2014). Evaluation of host and viral factors associated with severe dengue based on the 2009 WHO classification. *Parasit. Vectors.* **7**: 590.

- Ramos-Castañeda J., Barreto dos Santos F., Martínez-Vega R., Galvão de Araujo J. M., Joint G. & Sarti E. (2017). Dengue in Latin America: Systematic Review of Molecular Epidemiological Trends. *PLoS Negl Trop Dis.* **11(1)**: e0005224. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005224>.
- Reiter P., Nathan M., World Health Organization. Strategy Development and Monitoring for Parasitic Diseases and Vector Control Team. (2003). Guías para la evaluación de la eficacia del rociado espacial de insecticidas para el control del vector del dengue *Aedes aegypti* / por P. Reiter y M. B. Nathan. Ginebra :Organización Mundial de la Salud. [Documento en línea]. <http://www.who.int/iris/handle/10665/68400>[Consulta: Febrero 12, 2017].
- Rodríguez I., Sáez Sáez V, Rubio-Palis Y. & Vásquez M. (2007). *Estudio preliminar: zonas de amenaza epidemiológica de dengue bajo condiciones de estacionalidad de la lluvia (1997-2002)*. Área Metropolitana de Maracay, estado Aragua, Venezuela. *Terra Nueva Etapa*, 23:127-159.
- Rodríguez-Roche R., Villegas E., Cook S., Poh Kim P., Hinojosa Y., Rosario D., *et al.* (2012). Population structure of the dengue viruses, Aragua, Venezuela, 2006–2007. Insights into dengue evolution under hyperendemic transmission. *Infect. Genet. Evol.* **12**: 332–344.
- Rubio-Palis Y., Guzmán H., Sánchez V. & Pérez-Ybarra L. M. (2017). Fluctuaciones poblacionales de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) y casuística de dengue en seis municipios del estado Aragua, Venezuela. *Bol. Mal. Salud Amb.* **57**: 01-16.
- Rubio-Palis Y., Pérez-Ybarra L. M., Infante-Ruiz M., Comach G. & Urdaneta L. (2011). Influencia de las variables climáticas en la casuística de dengue y la abundancia de *Aedes aegypti* (Diptera; Culicidae) en Maracay, Venezuela. *Bol. Mal. Salud Amb.* **51**: 145-157.
- Rueda L. M. (2004). Pictorial key for identification mosquitoes (Diptera: Culicidae) associate with dengue virus transmission. *Zootaxa.* 589: 1-60.
- Salas-Benito J. S. & De Nova-Ocampo M. (2015). Viral Interference and Persistence in Mosquito-Borne Flaviviruses. *J Immunol. Res.* **2015**: 873404.
- Urdaneta L., Herrera F., Pernaleté M., Zoghbi N., Rubio-Palis Y., Barrios R., *et al.* (2005). Detection of dengue viruses in field-caught *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) in Maracay, Aragua state, Venezuela by type-specific polymerase chain reaction. *Infect. Genet. Evol.* **5**: 177–184.

Recibido el 15/04/2020
Aceptado el 23/07/2020