

ARTÍCULO ORIGINAL

Vigilancia virológica de *Aedes (Stegomyia) aegypti* y *Aedes (Stegomyia) albopictus* como apoyo para la adopción de decisiones en el control del dengue en Medellín

Juliana Pérez-Pérez¹, William H. Sanabria², Carolina Restrepo², Raúl Rojo², Enrique Henao², Omar Triana³, Ana María Mejía³, Sandra M. Castaño³, Guillermo L. Rúa-Urbe¹

¹ Grupo de Entomología Médica, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia

² Secretaría de Salud de Medellín, Medellín, Colombia

³ Grupo de Biología y Control de Enfermedades Infecciosas, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia

Introducción. El dengue en Colombia representa un grave problema de salud y, dado que no existe un tratamiento efectivo para la enfermedad y la vacuna no se ha aprobado en todos los países, se deben fortalecer acciones para mitigar su impacto mediante el control de *Aedes aegypti*, el mosquito vector. La vigilancia en el país se hace con base en los índices entomológicos y en la notificación de casos, la cual es frecuentemente tardía y por ello conduce a falta de oportunidad en las intervenciones. La detección viral en mosquitos urbanos mediante técnicas moleculares proporciona información entomológica más precisa para la adopción de decisiones.

Objetivo. Reportar los resultados de la vigilancia virológica de especímenes de *Aedes* spp. recolectados durante actividades entomológicas rutinarias de la Secretaría de Salud de Medellín.

Materiales y métodos. Los ejemplares se recolectaron durante dos periodos, en cada uno de los cuales se seleccionaron 18 viviendas alrededor de cada una de las 250 trampas para larvas dispuestas para la vigilancia entomológica, así como 70 instituciones educativas y 30 centros de salud. Los ejemplares se identificaron y se conformaron grupos para la detección viral mediante reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (*Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction*, RT-PCR). Se calculó la tasa mínima de infección y el índice de infestación en adultos.

Resultados. Se recolectaron 1.507 mosquitos, 10 de los cuales eran *Ae. albopictus*. De los 407 grupos conformados, 132 (uno de ellos de *Ae. albopictus*) fueron positivos, y 14,39 % correspondió a machos de *Ae. aegypti*. La tasa mínima de infección para *Ae. aegypti* fue de 120,07 y 69,50 en el primer y segundo periodos, respectivamente, y el índice de infestación en adultos fue mayor en las instituciones educativas (23,57 %).

Conclusión. Mediante la RT-PCR se detectaron la infección natural y la transmisión vertical del virus del dengue en *Ae. aegypti* y en *Ae. albopictus*. Se propone considerar la incorporación de estas técnicas moleculares en los programas de vigilancia y control de las arbovirosis en el país.

Palabras clave: *Aedes*; virus del dengue; vectores de enfermedades; vigilancia.

doi: <https://doi.org/10.7705/biomedica.v34i2.3467>

Virological surveillance of *Aedes (Stegomyia) aegypti* and *Aedes (Stegomyia) albopictus* as support for decision making for dengue control in Medellín

Introduction: Dengue represents an important public health problem in Colombia. No treatment is available and the vaccine has not been approved in all countries, hence, actions should be strengthened to mitigate its impact through the control of *Aedes aegypti*, the vector mosquito. In Colombia, surveillance is done using entomological indexes and case notification, which is usually informed late, leading to untimely interventions. Viral detection in urban mosquitoes using molecular techniques provides more accurate entomological information for decision-making.

Objective: To report results of virological surveillance in *Aedes* specimens collected during routine entomological activities of the *Secretaría de Salud de Medellín*.

Materials and methods: Specimens were collected during two periods in each of which we selected 18 dwellings around each one of the 250 larva traps arranged for mosquito surveillance, as well

Contribución de los autores:

Juliana Pérez-Pérez: diseño de la metodología de muestreo, identificación taxonómica y procesamiento de muestras

William H. Sanabria, Carolina Restrepo, Raúl Rojo, Enrique Henao: diseño de la metodología de muestreo

Omar Triana, Ana María Mejía y Sandra M. Castaño: procesamiento de las muestras

Guillermo L. Rúa-Urbe: diseño de la metodología de muestreo y verificación taxonómica

Todos los autores participaron en el análisis de la información y la escritura del manuscrito.

as 70 educational institutions and 30 health centers. Specimens were identified morphologically, and divided in pools for viral detection using reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). We calculated the minimum infection rate and the adult infestation index for each group.

Results: We collected 1,507 adult mosquitoes, 10 of which were identified as *A. albopictus*. Out of the 407 pools, 132 (one of them *Ae. albopictus*) were positive, and 14.39% were *A. aegypti* males. The minimum infection rates for *Ae. aegypti* were 120.07 and 69,50 for the first and second periods, respectively, and the adult infestation index was higher in educational institutions (23.57%).

Conclusions: Using RT-PCR we identified natural infectivity and vertical transmission of dengue virus in *A. aegypti* and *A. albopictus*. We suggest the use of molecular techniques in arbovirology surveillance and control programs in Colombia.

Key words: *Aedes*; dengue virus; disease vectors; surveillance.

doi: <https://doi.org/10.7705/biomedica.v34i2.3467>

El dengue es la enfermedad viral transmitida por vectores de mayor impacto en la morbilidad, la mortalidad y las condiciones socioeconómicas de más de 3.900 millones de personas en riesgo en el mundo (1,2). La enfermedad es causada por el virus del dengue (DENV), miembro del género *Flavivirus*, del cual se conocen cuatro serotipos estrechamente relacionados (3). El virus es transmitido por la picadura de hembras de *Aedes* (*Stegomyia*) *aegypti* (Linnaeus, 1762) y *Aedes* (*Stegomyia*) *albopictus* (Skuse, 1894) (4,5), ambos presentes en Colombia (6).

En el país, el dengue representa un problema prioritario de salud pública debido a su elevada transmisión, a la circulación simultánea de los diferentes serotipos y a la presencia del vector en más de 90 % del territorio nacional situado por debajo de los 2.200 msnm (7), aunque recientemente se reportó a una altura de 2.302 msnm en Bello, Antioquia (8). En el 2016, se registraron, aproximadamente, 104.000 casos de dengue y 60 muertes confirmadas por unidad de análisis en el país (9), datos que podrían ser muy superiores dado el subregistro que se estima para esta enfermedad (10).

Antioquia es el segundo departamento del país en cuanto a la notificación de casos de dengue (11) y, dadas las características ecoepidemiológicas aptas para la transmisión de la enfermedad de Medellín, su capital (12), y al comportamiento endémico y epidémico del dengue allí, se la ha categorizado como una ciudad hiperendémica (13).

En la actualidad, la Organización Mundial de la Salud (OMS) recomienda el empleo de una vacuna contra el dengue en algunos países de Latinoamérica (14). Sin embargo, en Colombia no se ha iniciado este programa de inmunización, razón por la cual se hace necesario reforzar la implementación de la estrategia de gestión integrada (EGI) para la vigilancia, la prevención y el control del dengue propuesta por la OMS y la Organización Panamericana de la Salud (OPS) (15).

En el marco de dicha estrategia, la inteligencia epidemiológica es una herramienta crucial, pues integra la información de la vigilancia epidemiológica y del laboratorio (entomológica, virológica y serológica) como soporte de las intervenciones de salud pública en este campo.

La vigilancia epidemiológica del dengue en Colombia se basa principalmente en las notificaciones de los casos reportados por las llamadas unidades primarias generadoras de datos, y en los levantamientos de índices entomológicos. Sin embargo, algunas veces los casos se reportan tardíamente en el sistema, por lo cual las decisiones para el control de la enfermedad resultan inoportunas. Por otro lado, los índices entomológicos, diseñados para determinar el riesgo de transmisión (16), han demostrado ser poco precisos. En este sentido, se ha observado poca relación entre los índices larvarios y la producción de mosquitos adultos, los cuales son los responsables de la transmisión (17). Varios autores han determinado que más de 80 % de los adultos de *Aedes* spp. provienen de menos del 20 % de los depósitos (18-20), y señalan que los índices aélicos tradicionales no deben considerarse como indicadores del riesgo epidemiológico (19,20). Por ejemplo, en el 2010, durante la mayor epidemia de dengue registrada en Medellín, no se observó relación entre los índices entomológicos tradicionales y la incidencia de la enfermedad (21).

Correspondencia:

Juliana Pérez, Grupo de Entomología Médica, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia, Carrera 51D N° 62-29, laboratorio 321, Medellín, Colombia

Teléfono: (574) 219 6061

jperezp1017@gmail.com

Recibido: 08/08/16; aceptado: 18/08/17

En este contexto, el empleo de técnicas moleculares para la detección del virus del dengue en mosquitos recolectados en campo se convierte en una estrategia que permite disponer de información entomológica de mayor precisión (6,22,23), la cual podría emplearse en un sistema de alerta temprana de apoyo a la adopción de medidas de control vectorial que mitiguen el impacto de la enfermedad.

Desde el 2015, la Secretaría de Salud de Medellín viene implementando la vigilancia virológica utilizando la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR) para la detección del virus del dengue en mosquitos *Aedes* recolectados en áreas urbanas, la cual ha demostrado ser una herramienta de apoyo eficiente de los programas de prevención y control de enfermedades transmitidas por vectores (ETV) en la ciudad. En el presente estudio se presentan los resultados más relevantes de este sistema de vigilancia virológica en mosquitos.

Materiales y métodos

Área de estudio

Medellín se encuentra situado en el valle de Aburrá, a 75° 34', 05"O y 6° 13', 55"N; su extensión es de 376,2 km² y la atraviesa de norte a sur el río Medellín. Topográficamente, la ciudad es un plano inclinado que desciende desde los 1.800 a los 1.500 msnm. La latitud y la altitud de la ciudad dan como resultado un clima subtropical subhúmedo, con una temperatura ambiental en la zona urbana que oscila entre los 16 y los 28 °C. Aunque no tiene estaciones, frecuentemente el comienzo y la mitad del año son periodos secos; durante el resto del año el clima es variable, pero con abundantes lluvias, lo que resulta en una precipitación media anual de 1.656 mm.

La ciudad cuenta con 16 comunas urbanas y cinco suburbanas. Exceptuando dos de las comunas suburbanas (Santa Elena y San Sebastián de Palmitas), cuyas características climáticas no permiten la supervivencia del vector, los mosquitos se recolectaron en toda la ciudad.

Recolección de mosquitos

La Secretaría de Salud de Medellín cuenta con un sistema de vigilancia del vector conformado por 250 trampas para larvas, las cuales se encuentran distribuidas uniformemente en toda la ciudad en una configuración basada en polígonos de Thiessen (figura 1). Los muestreos se hicieron durante dos periodos del 2016: febrero a marzo y mayo a junio.

Para cada período de muestreo, se seleccionaron aleatoriamente 18 viviendas alrededor de cada una de las trampas, para un total de 4.500 viviendas. Además, se recolectaron mosquitos en 70 instituciones educativas y 30 centros de salud, seleccionados también aleatoriamente en cada período.

Se hizo búsqueda activa de ejemplares durante 15 minutos en cada lugar de muestreo, se recolectaron con un aspirador bucal y se almacenaron en tubos Falcon de 50 ml tapados con tela de tul, con el fin de transportarlos vivos hasta el Laboratorio de Entomología Médica de la Universidad de Antioquia, donde se identificaron taxonómicamente siguiendo la clave morfológica de Rueda (24). Posteriormente, se conformaron grupos por especie (*Ae. aegypti* y *Ae. albopictus*), ubicación de la trampa de larvas y sexo, aunque, debido al reducido número de ejemplares, en algunas ocasiones los grupos se conformaron con ejemplares de ambos sexos a fin de optimizar los recursos.

Una vez conformados los grupos con un máximo de 11 mosquitos para ampliar su sensibilidad, se llevaron al Laboratorio de Biología y Control de Enfermedades Infecciosas (BCEI) de la Universidad de Antioquia para el análisis molecular.

Análisis molecular

En la detección viral se empleó la técnica de RT-PCR. Cada grupo de mosquitos se maceró mecánicamente; el ARN se extrajo utilizando el estuche comercial de RNeasy Mini Kit® (Qiagen) siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante. Posteriormente, se hizo la síntesis del ADN complementario (ADNc) utilizando 10 µl del ARN extraído, 1X de solución tampón específica de la transcriptasa inversa, 1 mM de dNTP, 10 µM de un cebador específico del virus del dengue (DV3-5'-AARTGIGCYTCRTC CAT-3') y 1 µl de transcriptasa inversa (Fermentas); la mezcla se incubó a 42 °C durante una hora y la enzima se inactivó a 94 °C durante 10 minutos.

Para la amplificación del virus, se utilizaron 3 µl del ADNc; 1X de solución tampón; 2,0 mM de MgCl₂; 0,2 mM de dNTP; 0,2 µM de cada cebador específico (DSP1-5'-AGTTTCTTTTCCTAAACACCTCG-3' para DENV-1; DSP2 -5'-CCGGTGTGCTCRG CYCTGAT-3' para DENV-2; DSP3 -5'-TTAGAGT YCTTAAGCGTCTCTTG -3' para DENV-3, y DSP4 -5'-CCTGGTTGATGACAAAAGTCTTG-3' para DENV-4), y 0,5 U de taq ADN polimerasa (25).

Las condiciones de amplificación consistieron en una temperatura inicial de 95 °C durante 2 minutos, 35 ciclos a 95 °C durante 30 segundos, a 55 °C

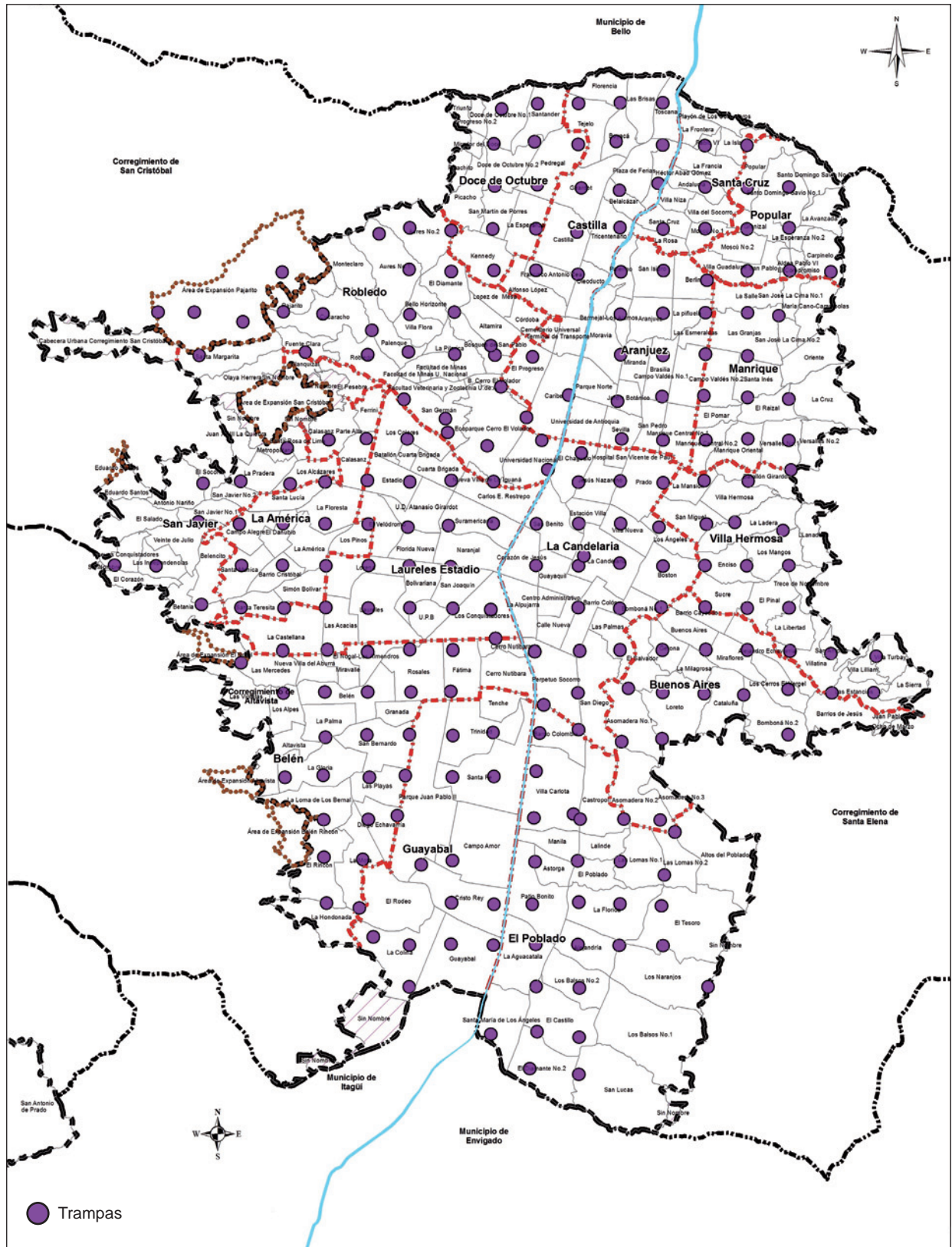


Figura 1. Ubicación geográfica de las trampas para larvas, que conforman el sistema de vigilancia entomológica de la Secretaría de Salud de Medellín.

durante 1 minuto y a 72 °C durante 40 segundos, con una extensión final a 72 °C durante 3 minutos.

Los productos de amplificación se analizaron bajo luz UV en geles de agarosa al 2 % teñidos con bromuro de etidio. El tamaño esperado para los serotipos DENV1, DENV2, DENV3 y DENV4 fue de 169, 362, 265 y 426 pares de bases (pb), respectivamente. En cada reacción se incluyeron controles negativos de extracción y amplificación; como control positivo, se utilizó el ARN de los cuatro serotipos del virus proveniente del sobrenadante de células infectadas, procesado simultáneamente y de la misma manera que los grupos de mosquitos.

Por último, para confirmar la presencia del virus en los grupos, se enviaron a MacroGen (Seúl, Corea) 22 muestras positivas seleccionadas aleatoriamente, 16 del primer muestreo y seis del segundo, para su secuenciación. Las secuencias hacia adelante y hacia atrás de cada una de las muestras y de los controles positivos se alinearon manualmente usando el programa BioEdit, versión 7.2.5, y se compararon con la base de datos del GenBank mediante el algoritmo BLASTN.

Análisis de la información

En el presente estudio se consideró como grupo positivo aquel con un único mosquito infectado, lo cual permitió estimar la tasa mínima de infección (26). Sin embargo, según Gu, *et al.* (27), tal presunción podría perder validez si las tasas de infección son altas o si los grupos están conformados por muchos ejemplares. Para obviar esta situación, el número máximo de mosquitos evaluados por grupo se estableció en 11 individuos, y algunos grupos estuvieron conformados por un solo ejemplar. La tasa mínima de infección se calculó dividiendo el

número de grupos positivos por el número total de especímenes evaluados multiplicado por 1.000 (26). Para cada periodo de muestreo, se estimó la correspondiente tasa mínima de infección.

Asimismo, se estimó el índice de infestación de mosquitos adultos (IIA), un indicador aéxico tradicional propuesto por la Organización Panamericana de la Salud para determinar el riesgo entomológico de transmisión (16). Este se calculó como el número de localidades (viviendas, instituciones educativas o centros de salud) con presencia de mosquitos adultos dividido por el número de localidades visitadas y multiplicado por 100. El IIA permitió comparar el riesgo entomológico por localidades y por periodo de muestreo.

Resultados

Se recolectaron 1.507 mosquitos durante ambos muestreos, de los cuales 1.497 correspondieron a *Ae. aegypti* (805 hembras y 692 machos) y 10 a *Ae. albopictus* (siete hembras y tres machos). La mayoría de los mosquitos (64,5 %) se recolectaron durante el segundo periodo de muestreo (cuadro 1).

Las viviendas fueron los sitios en donde mayor cantidad de mosquitos se recolectó durante los dos periodos (1.362), seguidas por las instituciones educativas (119) y los centros de salud (26) (cuadro 1). Sin embargo, cuando se calculó el IIA por tipo de localidad, se observó que, proporcionalmente, las instituciones educativas fueron los lugares con mayor presencia de mosquitos (23,57 %), seguidas de las unidades de salud (15 %) y, por último, las viviendas (9,30 %). Tal comportamiento en el porcentaje de infestación fue similar en los dos periodos de muestreo (figura 2).

Cuadro 1. Número de mosquitos *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus* recolectados en diferentes localidades durante los dos periodos de muestreo

	Localidad	<i>Aedes aegypti</i>			<i>Aedes albopictus</i>			Total
		H (n)	M (n)	T (n)	H (n)	M (n)	T (n)	
Primer período	Viviendas	275	211	486	1	0	1	487
	Instituciones educativas	19	22	41	1	0	1	42
	Centros de salud	5	1	6	0	0	0	6
	Subtotal	299	234	533	2	0	2	535
Segundo período	Viviendas	465	406	871	3	1	4	875
	Instituciones educativas	30	43	73	2	2	4	77
	Centros de salud	11	9	20	0	0	0	20
	Subtotal	506	458	964	5	3	8	972
Total		805	692	1.497	7	3	10	1.507

H: mosquito hembra; M: mosquito macho; T: suma de la cantidad de mosquitos hembras y machos

Se conformaron 407 grupos con los mosquitos recolectados, 171 en el primer período y 236 en el segundo; 400 de estos grupos estaban conformados por mosquitos *Ae. aegypti*, la especie más abundante (169 en el primer período y 231 en el segundo), y siete, por *Ae. albopictus* (dos en el primer período y cinco en el segundo).

El análisis molecular mediante RT PCR evidenció que 132 grupos eran positivos para el virus del dengue, 65 en el primer período y 67 en el segundo. El porcentaje de grupos positivos por período de muestreo fue mayor en el primer período de recolección (38,01 %).

Vale la pena resaltar que la mayoría de los grupos positivos durante el primer período contenía un solo ejemplar, mientras que en el segundo período contenían tres (cuadro 2). Además, se observó que el mayor número de grupos positivos se encontró

en las viviendas (119), seguidas de las instituciones educativas (10) y los centros de salud (3). Este comportamiento fue similar en los dos periodos de muestreo (cuadro 3).

De los 65 grupos positivos en el primer período, 64 correspondieron a *Ae. aegypti* y uno a *Ae. albopictus*, mientras que en el segundo período todos los grupos positivos correspondieron a *Ae. aegypti*. Además, 35 de los grupos positivos estaban conformados por mosquitos hembra (34 de *Ae. aegypti* y uno de *Ae. albopictus*), 19 por machos (todos de *Ae. aegypti*) y 78 por hembras y machos (todos de *Ae. aegypti*) (cuadro 4).

En cuanto a la tasa mínima de infección en *Ae. aegypti*, esta fue de 120,07 en el primer período y de 69,50 en el segundo, en tanto que la de *Ae. albopictus* fue de 500 en el primer período.

Se obtuvieron resultados de la secuenciación para 21 de las 22 muestras enviadas, y en todas ellas se identificó el virus del dengue, lo cual confirmó el resultado obtenido mediante la amplificación por PCR. Cinco de las muestras secuenciadas pertenecían a grupos que solo tenían un individuo macho, cuatro de las cuales fueron corroboradas por secuenciación, confirmando así la transmisión vertical (cuadro 5).

El análisis espacial evidenció que los grupos positivos del primer período se ubicaron en 56 barrios de la ciudad, en tanto que en el segundo período se ubicaron en 52 barrios. Asimismo, se encontraron grupos positivos en 16 barrios durante los dos periodos: Bosques de San Pablo, San Germán y Universidad Nacional (comuna 7); Los Mangos y Las Estancias (comuna 8); Buenos Aires (comuna 9); Bomboná N° 1 (comuna 10); Las Acacias, Laureles y Lorena (comuna 11); Los Pinos (comuna 12); La Florida y Astorga (comuna 14); Diego Echavarría y Belén Rincón (comuna 16), y San Antonio de Prado (comuna 80) (figuras 3 y 4).

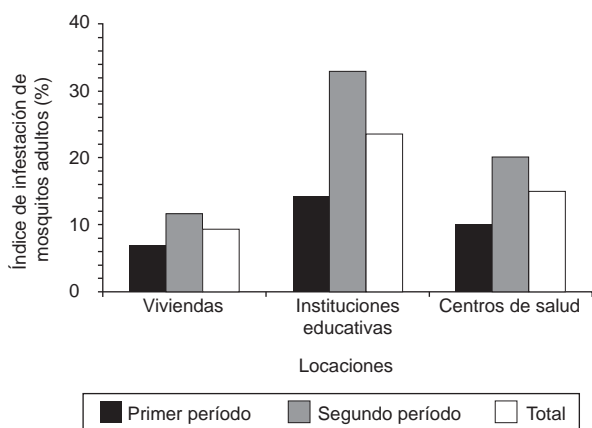


Figura 2. Índice de infestación de mosquitos adultos para las diferentes localidades en los periodos de muestreo

Cuadro 2. Cantidad de mosquitos por grupos positivos para el virus del dengue recolectados en los dos periodos de muestreo

N° mosquitos/grupo	Total de grupos positivos Primer periodo	Total de grupos positivos Segundo periodo
1	25	9
2	12	10
3	7	11
4	8	4
5	3	10
6	1	2
7	3	8
8	3	5
9	2	3
10	1	4
11	0	1
Total	65	67

Discusión

En el presente estudio se pudo comprobar la utilidad de la vigilancia virológica en los mosquitos para la adopción de decisiones en torno al control del dengue. Se comprobó la infección con el virus del dengue tanto en ejemplares de *Ae. aegypti* (hembras y machos) como de *Ae. albopictus* (hembras) provenientes de diferentes barrios de Medellín, lo cual evidenció la amplia circulación geográfica del virus en la ciudad. Es importante mencionar las altas tasas de infección observadas,

Cuadro 3. Número de grupos conformados y de grupos positivos para el virus del dengue por localidad durante los dos periodos de muestreo

Localidad	Grupos conformados			Grupos positivos			Positividad del grupo
	Primer período	Segundo período	Total	Primer período	Segundo período	Total	
Viviendas	158	209	367	59	58	119	32,43
Instituciones educativas	10	21	31	5	7	10	32,26
Centros de salud	3	6	9	1	2	3	33,33
Total	171	236	407	65	67	132	32,43

Cuadro 4. Grupos de mosquitos *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus* recolectados en los dos periodos de muestreo

	Especie	Grupo	Número de grupos conformados	Número de grupos positivos
Primer periodo	<i>Aedes aegypti</i>	Hembras	54	26
		Machos	28	10
		Hembras y machos	87	28
	<i>Aedes albopictus</i>	Hembras	2	1
		Machos	0	0
Hembras y machos		0	0	
Segundo periodo	<i>Aedes aegypti</i>	Hembras	42	8
		Machos	44	9
		Hembras y machos	145	50
	<i>Aedes albopictus</i>	Hembras	3	0
		Machos	1	0
		Hembras y machos	1	0

Cuadro 5. Resultados de la secuenciación de los grupos analizados y sus respectivos controles

Muestreo	Nombre del grupo	Número de mosquitos/grupo	Diagnóstico por PCR	Resultado del BLASTN Identidad (%)/valor esperado	Verificación por secuenciación	
Primer periodo	20160041	1	D1-D4	97/4x10 ⁻¹⁵⁵	D4	
	20160048	1	D4	98/4x10 ⁻¹⁷⁸	D4	
	20160055	1	D1	No hit	-	
	20160062	1	D4	98/6x10 ⁻¹⁷⁷	D4	
	20160066	1	D4	97/0	D4	
	20160098	7	D1-D4	99/1x10 ⁻¹³⁴	D4	
	20160102	2	D1-D4	99/3x10 ⁻¹³⁰	D4	
	20160107	1	D1-D4	99/5x10 ⁻¹³⁸	D4	
	20160113	10	D4	99/2x10 ⁻¹³⁵	D4	
	20160116	2	D4	99/0	D4	
	20160128	2	D1-D4	96/6x10 ⁻¹⁴⁴	D4	
	20160141	1	D1-D4	96/4x10 ⁻¹³⁶	D4	
	20160148	6	D1-D4	98/0	D4	
	20160164	9	D4	94/2x10 ⁻⁴⁵	D4	
	20160109	7	D2	98/1x10 ⁻⁶³	D2	
	20160111	1	D2	79/1x10 ⁻⁴⁸	D2	
	Segundo periodo	20160315	2	D3	99/2x10 ⁻⁹⁰	D3
		20160324	3	D3	99/6x10 ⁻⁷⁹	D3
		20160350	1	D4	98/8x10 ⁻⁷⁸	D4
20160380		1	D3	99/2x10 ⁻¹⁰⁰	D3	
20160333		3	D3	99/5x10 ⁻⁵⁹	D3	
20160348		2	Negativo	No hit	-	
Controles	Control DENV1	ARN de cultivo	D1	96/7x10 ⁻⁵³	D1	
	Control DENV2	ARN de cultivo	D2	99/1x10 ⁻¹⁶⁰	D2	
	Control DENV3	ARN de cultivo	D3	98/2x10 ⁻¹⁰⁸	D3	
	Control DENV4	ARN de cultivo	D4	100/0	D4	

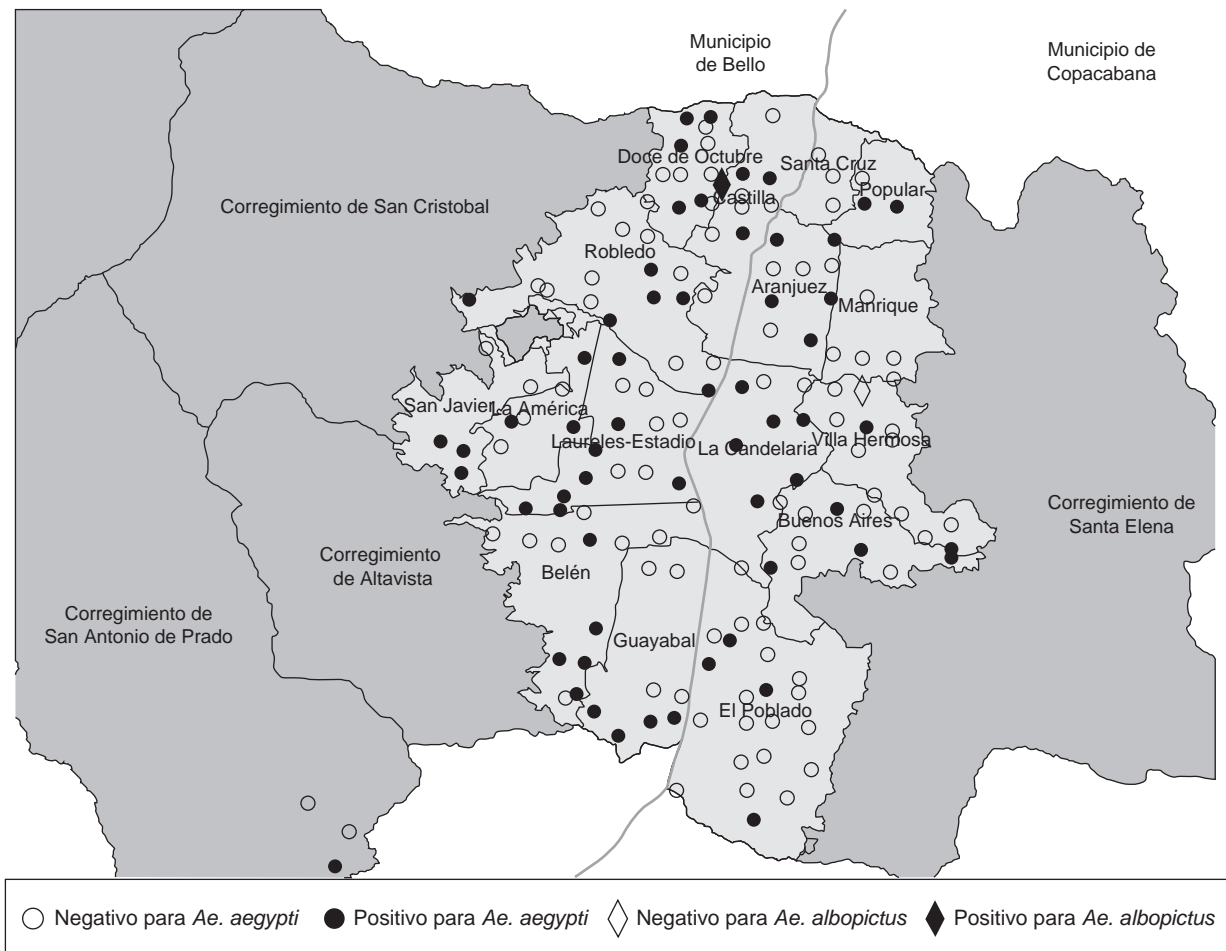


Figura 3. Ubicación geográfica de grupos de mosquitos positivos y negativos para el virus del dengue recolectados durante el primer período de muestreo (febrero a marzo de 2016)

lo cual concuerda con lo hallado por Pérez-Castro, *et al.* (28), en los municipios de Anapoima y La Mesa en Cundinamarca.

Las altas tasas de infección natural con el virus del dengue en *Ae. aegypti* no son sorprendentes si se considera la grave epidemia que registró la ciudad durante los periodos de recolección. En el Valle del Cauca, también se han reportado tasas de infección de *Ae. aegypti* significativamente mayores durante las epidemias que durante los periodos posteriores a estas (6). Igualmente, al analizar los resultados de la infección natural de *Ae. aegypti* en Armero-Guayabal (Tolima) y en Villeta (Cundinamarca), se comprobó que una gran proporción de mosquitos se infectaba durante las epidemias de dengue (29).

En Colombia, la infección natural de *Ae. aegypti* con el virus del dengue se ha reportado en otros estudios (6,8,30). Sin embargo, en el presente estudio se destacaron las altas tasas de infección

observadas, lo cual concuerda con lo hallado por Pérez-Castro, *et al.* (28), en los municipios de Anapoima y La Mesa en Cundinamarca.

Es posible que en Medellín las altas tasas de infección natural con el virus del dengue en *Ae. aegypti* estén asociadas con la grave epidemia que se registró en la ciudad durante los periodos de recolección. Similares hallazgos fueron reportados por Méndez, *et al.* (6), en el Valle del Cauca, con tasas de infección de *Ae. aegypti* significativamente mayores durante las epidemias que en los periodos posteriores a estas. Asimismo, en su estudio sobre la infección natural de *Ae. aegypti* en Armero, Guayabal (Tolima) y Villeta (Cundinamarca), Groot (31) observó que una gran proporción de los mosquitos se infectaban durante las epidemias de dengue.

Un resultado relevante en este estudio fue la infección natural con el virus del dengue en mosquitos machos de *Ae. aegypti*, ya que 15,38 y 13,43 %

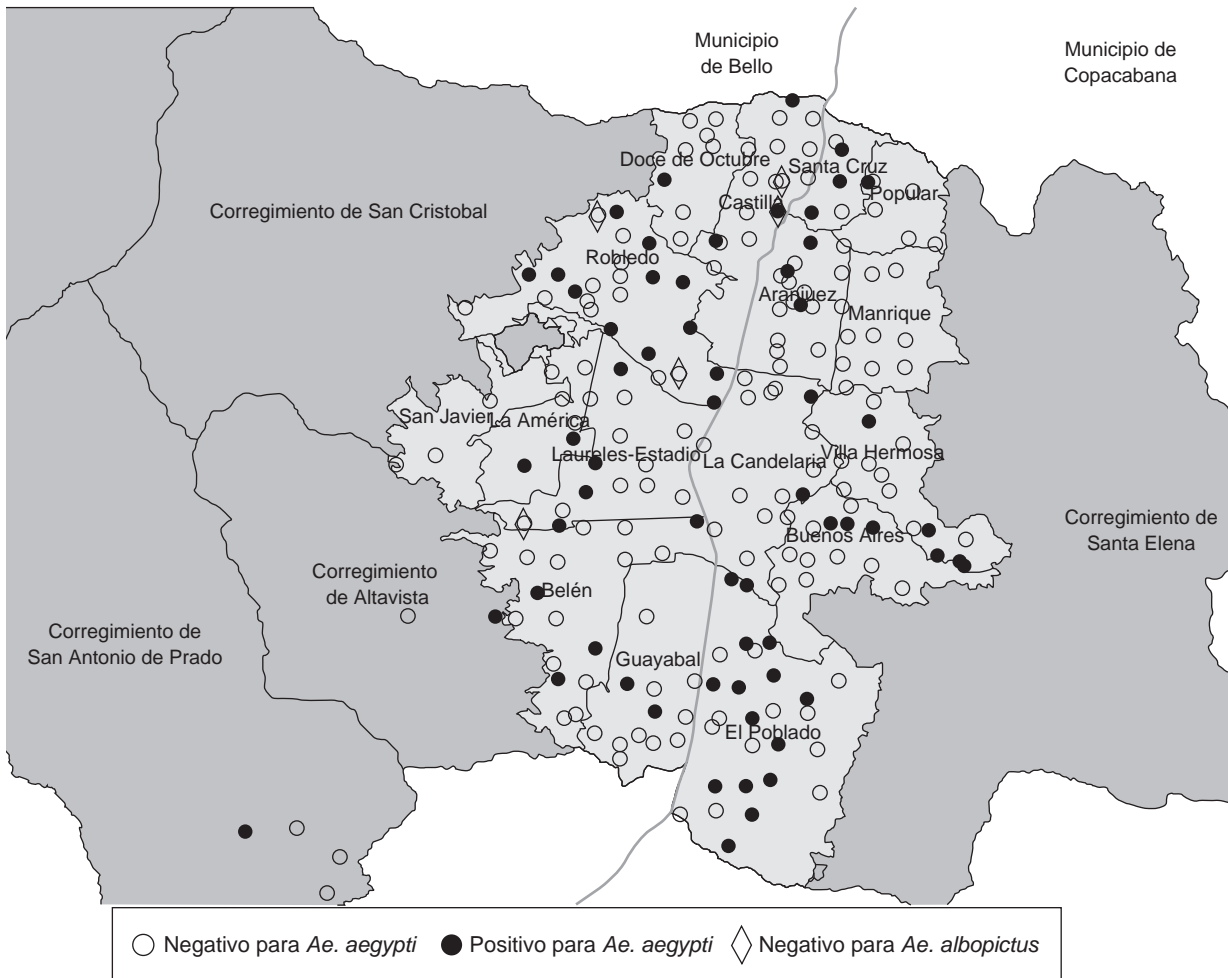


Figura 4. Ubicación geográfica de los grupos de mosquitos positivos y negativos para el virus del dengue recolectados durante el segundo período de muestreo (mayo a junio de 2016)

de los grupos positivos estaban conformados por machos en el primer periodo y en el segundo, respectivamente. La infección natural con el virus del dengue en mosquitos machos se debe a la transmisión vertical, tal como lo han señalado Joshi, *et al.* (32), Thenmozhi, *et al.* (33), y Pessoa, *et al.* (34). Especialmente en este último estudio se encontraron machos tanto de *Ae. aegypti* como de *Ae. albopictus* naturalmente infectados con el virus del dengue, aunque el porcentaje de infección (1,33%) de *Ae. aegypti* en el estudio de Pessoa, *et al.*, fue muy inferior en comparación con lo registrado en el presente estudio, posiblemente por la gran especificidad de los marcadores empleados en este.

La presencia de mosquitos machos infectados podría implicar el mantenimiento de la transmisión viral, tal como lo señalaron Espinosa, *et al.* (35) en su estudio sobre la epidemia de dengue en Puerto

Iguazú (Argentina), así como Le Goff, *et al.* (36) al observar la alta prevalencia de infección natural en mosquitos machos, incluso mayor que en las hembras, durante la epidemia de dengue del 2007 en Santa Cruz de La Sierra (Bolivia). Debe considerarse que la transmisión vertical, además de la aparición de machos infectados, también puede dar origen a mosquitos hembras infectadas, lo cual entrañaría un mayor riesgo de transmisión, ya que tales ejemplares no requerirían pasar por el período de incubación extrínseca del virus en el estadio adulto, como sí ocurre en la transmisión horizontal. Además, los mosquitos hembra infectados verticalmente pueden ser poco longevos y ser transmisores competentes del arbovirus (37).

En el caso de Medellín, es posible que los mosquitos machos con infección transmitida verticalmente actúen como reservorios del virus, en tanto que las

hembras tendrían la capacidad de transmitir el virus desde el momento en que llegan a su fase adulta, lo cual podría ayudar a explicar la grave epidemia que se registró en la ciudad durante el 2016. Además, los resultados de este estudio sugieren que los programas de vigilancia y control de las ETV no solo deben focalizar sus esfuerzos en la vigilancia entomológica de las hembras, sino también de los machos, pues estos podrían servir como indicadores de la presencia del virus en la naturaleza.

Con relación a la tasa mínima de infección, los valores observados en los dos períodos de muestreo (121,95 y 68,93, respectivamente) fueron considerablemente mayores que los reportados en otros estudios. Por ejemplo, Pérez-Castro, *et al.*, registraron una tasa de 33,3 en Anapoima y La Mesa (Cundinamarca) (28), en tanto que en Santa Cruz de la Sierra (Bolivia), Le Goff, *et al.*, registraron una de 1,01 (36). Un valor más próximo al registrado en este estudio en el segundo período de muestreo se reportó en Singapur (57,6) (38).

Es probable que la diferencia en los valores de la tasa mínima de infección en estos estudios se deba a las condiciones epidemiológicas propias de cada localidad, a las densidades poblacionales de las especies evaluadas y a la reacción de los ejemplares a variables ambientales y sociales propias de diferentes condiciones ecoepidemiológicas. Durante la recolección de los ejemplares en Medellín, la ciudad atravesaba por una grave epidemia de dengue, similar a la registrada en el 2010, año de una de las epidemias de dengue más graves registrada en las Américas (39). En este sentido vale recordar que, según Le Goff, *et al.* (36), la transmisión vertical del virus del dengue puede detectarse tanto en la etapa de máxima transmisión en una epidemia, como meses antes de ella.

En el presente estudio también se observó la infección natural de *Ae. albopictus* con el virus del dengue. Esta especie se reportó por primera vez en la ciudad en el 2011 (40), y según los informes de la Secretaría de Salud de Medellín, su distribución se ha venido ampliando paulatinamente. En Colombia, la infección natural de *Ae. albopictus* con el virus del dengue no se ha registrado con frecuencia. El primer registro fue en Buenaventura (Valle del Cauca) en el 2006 (6), en tanto que en Medellín este es el primer registro de infección natural de la especie. Sin embargo, en Singapur, México, Tailandia, Malasia e India, entre otros lugares, es común encontrar *Ae. albopictus* infectado naturalmente con el virus del dengue (38,41-44).

Aunque el papel vectorial de *Ae. albopictus* en el país todavía se desconoce, esta especie requiere vigilancia especial debido a su rápida y agresiva dispersión, con la cual ha colonizado todos los continentes, excepto la Antártica (45). Además, debe anotarse que esta especie ha sido el único vector responsable de diferentes brotes de dengue en lugares como Hawaii, algunas islas del océano Índico y China (45), y que, según los resultados de diversos estudios de competencia vectorial, podría transmitir más de 20 tipos de arbovirus, entre ellos el del chikungunya y el del oeste del Nilo (46). Por ello, las implicaciones epidemiológicas de *Ae. albopictus* en la transmisión de diferentes arbovirus en el país deben considerarse seriamente, con el fin de actualizar las estrategias de vigilancia, prevención y control (47).

En cuanto al IIA, en el presente estudio se observó que las instituciones educativas presentaban el mayor riesgo entomológico de transmisión, comparadas con las viviendas y los centros de salud. A pesar de que se ha considerado que los índices aédicos no son muy precisos (20), las instituciones educativas deben tenerse en cuenta como sitios prioritarios de intervención, e implementar en ellas programas formales de salud pública, tal como lo proponen Olano, *et al.* (48).

En conclusión, los resultados aquí reportados evidencian que la vigilancia virológica mediante técnicas moleculares constituye una poderosa herramienta para la vigilancia, la prevención y el control de las ETV, por lo cual debería incorporarse a los programas de dichas enfermedades en el país. Asimismo, sería recomendable hacerla extensiva a virus como el del Zika y el del chikungunya, que circulan en el país y cuyo principal vector también es *Ae. aegypti*.

Agradecimientos

Los autores expresan sus sinceros agradecimientos a las personas que permitieron el ingreso a sus viviendas para los muestreos entomológicos, así como a la Secretaría de Salud de Medellín, por el apoyo logístico y por facilitar la información entomológica y virológica, y a la Universidad de Antioquia, al Sistema de Información para la Investigación Universitaria y a la Corporación Académica para el Estudio de Patologías Tropicales, proyecto con código CPT1403, del cual este estudio hizo parte.

Conflicto de intereses

Los autores manifestamos que no existe ningún conflicto de intereses relacionado con los resultados presentados en este documento.

Financiación

Este estudio se realizó gracias a los convenios interadministrativos firmados entre la Secretaría de Salud de Medellín y la Universidad de Antioquia (Grupo de Entomología Médica, Facultad de Medicina). El grupo BCEI recibió apoyo de la Universidad de Antioquia.

Referencias

1. Hales S, de Wet N, Mairdona J, Woodward A. Potential effect of population and climate changes on global distribution of dengue fever: An empirical model. *Lancet*. 2002;360:830-4. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(02\)09964-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(02)09964-6)
2. Brady OJ, Gething PW, Bhatt S, Messina JP, Brownstein JS, Hoen AG, et al. Refining the global spatial limits of dengue virus transmission by evidence-based consensus. *PLoS Negl Trop Dis*. 2012;6:e1760. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001760>
3. Velandía ML, Castellanos JE. Virus del dengue: estructura y ciclo viral. *Infectio*. 2011;15:33-43. [https://doi.org/10.1016/S0123-9392\(11\)70074-1](https://doi.org/10.1016/S0123-9392(11)70074-1)
4. Delatte H, Paupy C, Dehecq J-S, Thiria J, Failloux A, Fontenille D. *Aedes albopictus*, vecteur des virus du chikungunya et de la dengue a la Réunion: biologie et contrôle. *Parasite*. 2008;15:3-13. <https://doi.org/10.1051/parasite/2008151003>
5. Kyle JL, Harris E. Global spread and persistence of dengue. *Annu Rev Microbiol*. 2008;62:71-92. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.62.081307.163005>
6. Méndez F, Barreto M, Arias JF, Rengifo G, Muñoz J, Burbano ME, et al. Human and mosquito infections by dengue viruses during and after epidemics in a dengue-endemic region of Colombia. *Am J Trop Med Hyg*. 2006;74:678-83. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2006.74.678>
7. Padilla J, Rojas D, Sáenz-Gómez R. Dengue en Colombia: epidemiología de la reemergencia a la hiperendemia. Primera edición. Bogotá: Guías de Impresión Ltda.; 2012. p. 248.
8. Ruiz-López F, González-Mazo A, Vélez-Mira A, Gómez GF, Zuleta L, Uribe S, et al. Presencia de *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus, 1762) y su infección natural con el virus dengue en alturas no registradas para Colombia. *Biomédica*. 2016;36:303-8. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v36i2.3301>
9. Instituto Nacional de Salud. Boletín epidemiológico semana 52. Fecha de consulta: 1° de agosto de 2017. Disponible en: <http://www.ins.gov.co/boletin-epidemiologico/BoletnEpidemiolgico/2015Boletinepidemiologico%20Semana%2052.pdf>
10. Gubler DJ. Surveillance for dengue and dengue hemorrhagic fever. *Bull Pan Am Health Organ*. 1998;23:397-404.
11. Instituto Nacional de Salud. Boletín epidemiológico semana 23. Fecha de consulta: 1 de marzo de 2016. Disponible en: <http://www.ins.gov.co/boletin-epidemiologico/Boletn%20Epidemiolgico/2016%20Bolet%20C3%ADn%20epidemiolgico%20B3gico%20semana%2023.pdf>
12. Ortiz RC, Rúa-Urbe G, Suárez AC, Mafla MA, Almanza R, Laurentino dos Santos S. Distribución espacial de casos e incidencia de dengue: análisis de la situación para Medellín. *Revista Facultad Nacional de Salud Pública*. 2013;31:330-37.
13. Ministerio de Salud y Protección Social de Colombia. Situación actual de dengue a semana 12 de 2013. Periodo de análisis: 2008-2013. Fecha de consulta: 2 de marzo de 2016. Disponible en: <https://www.minsalud.gov.co/Documentos%20y%20Publicaciones/INFORME%20SITUACION%20DE%20DENGUE.pdf>.
14. World Health Organization. Dengue: Prevention and control. Fecha de consulta: 2 de marzo de 2016. Disponible en: http://apps.who.int/gb/ebwha/pdf_files/EB136/B136_24-en.pdf
15. Gómez-Dantés H, San Martín JL, Danis-Lozano R, Manrique-Saide P. La estrategia para la prevención y el control integrado del dengue en Mesoamérica. *Salud Pública Méx*. 2011;53:S349-57.
16. Pan American Health Organization. Dengue and dengue hemorrhagic fever in the Americas: Guidelines for prevention and control. Fecha de consulta: 4 de marzo de 2016. Disponible en: http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_topics&view=rdmore&cid=6134&Itemid=40734&lang=en
17. Focks D. A review of entomological sampling methods and indicators for dengue vectors. *WHO/TDR/IDE/Den/2003.1*. Geneva: WHO; 2003. p. 38
18. Focks D, Villegas E, Romero-Vivas CM, Midega J, Bisset J, Morrison A, et al. Multicountry study of *Aedes aegypti* pupal productivity survey methodology- Findings and recommendations. *WHO/TDR/IDE/Den/2006.1*. Geneva: WHO; 2006. p. 48.
19. Bowman LR, Runge-Ranzinger S, McCall PJ. Assessing the relationship between vector indices and dengue transmission: A systematic review of the evidence. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014;8:e2848. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002848>
20. Boyer S, Foray C, Dehecq JS. Spatial and temporal heterogeneities of *Aedes albopictus* density in La Reunion Island: Rise and weakness of entomological indices. *PLoS One*. 2014;9:e91170. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0091170>
21. Calle D, Henao E, Rojo R, Almanza R, Rúa-Urbe G. Experiencias en el control integrado de la epidemia de dengue del año 2010 en Medellín. *Revista Facultad Nacional de Salud Pública Medellín*. 2011;5:77-88.
22. Lee KS, Lai YL, Lo S, Barkham T, Aw P, Ooi PL, et al. Dengue virus surveillance for early warning, Singapore. *Emerg Infect Dis*. 2010;16:847-49. <https://doi.org/10.3201/eid1605.091006>.
23. Urdaneta L, Herrera F, Pernalet M, Zoghbi N, Rubio-Palis Y, Barrios R, et al. 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*. 2005;5:177-84. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2004.09.004>
24. Rueda LM. Pictorial keys for the identification of mosquitoes (Diptera: Culicidae) associated with dengue virus transmission. *Zootaxa*. 2004;589:1-60. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.589.1.1>
25. Seah CL, Chow VT, Tan HC, Chan YC. Rapid, single-step RT-PCR typing of dengue viruses using five NS3 gene primers. *J Virol Methods*. 1995;51:193-200. [https://doi.org/10.1016/0166-0934\(94\)00104-O](https://doi.org/10.1016/0166-0934(94)00104-O)

26. **Walter SD, Hildreth SW, Beaty BJ.** Estimation of infection rates in population of organisms using pools of variable size. *Am J Epidemiol.* 1980;112:124-8. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aje.a112961>
27. **Gu W, Lampman R, Novak R.** Problems in estimating mosquito infection rates using minimum infection rate. *J Med Entomol.* 2003;40:595-6. <https://doi.org/10.1603/0022-2585-40.5.595>
28. **Pérez-Castro R, Castellanos JE, Olano VA, Matiz MI, Jaramillo JF, Vargas SL, et al.** Detection of all four dengue serotypes in *Aedes aegypti* female mosquitoes collected in a rural area in Colombia. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2016;111:233-40. <https://doi.org/10.1590/0074-02760150363>
29. **Groot H, Morales A, Romero M, Ferro C, Prías E, Vidales H, et al.** Estudios de arbovirosis en Colombia en la década de 1970. *Biomédica.* 1996;16:331-44.
30. **Romero-Vivas CM, Leake CJ, Falconar AK.** Determination of dengue virus serotypes in individual *Aedes aegypti* mosquitoes in Colombia. *Med Vet Entomol.* 1998;12:284-8. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2915.1998.00117.x>
31. **Groot H.** The reinvasion of Colombia by *Aedes aegypti*: Aspects to remember. *Am J Trop Med Hyg.* 1980;29:330-8. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1980.29.330>
32. **Joshi V, Mourya DT, Sharma RC.** Persistence of dengue-3 virus through transovarial transmission passage in successive generations of *Aedes aegypti* mosquitoes. *Am J Trop Med Hyg.* 2002;67:158-61. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2002.67.158>
33. **Thenmozhi V, Hiriyan JG, Tewari SC, Samuel PP, Paramasivan R, Rajendran R, et al.** Natural vertical transmission of dengue virus in *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in Kerala, a Southern Indian State. *Jpn J Infect Dis.* 2007;60:245-9.
34. **Pessoa VE, Alencar CH, Kamimura MT, Kamimura MT, de Carvalho Araujo FM, De Simone SG, et al.** Occurrence of natural vertical transmission of dengue-2 and dengue-3 viruses in *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in Fortaleza, Ceará, Brazil. *PLoS One.* 2012;7:e41386. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0041386>
35. **Espinosa M, Giampiretti S, Abril M, Seijo A.** Vertical transmission of dengue virus in *Aedes aegypti* collected in Puerto Iguazú, Misiones, Argentina. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2014;56:165-7. <https://doi.org/10.1590/S0036-46652014000200013>
36. **Arunachalam N, Tewari SC, Thenmozhi V, Rajendran R, Paramasivan R, Manavalan R, et al.** Natural vertical transmission of dengue viruses by *Aedes aegypti* in Chennai, Tamil Nadu, India. *Indian J Med Res.* 2008;127:395-7.
37. **Rosen L.** Mechanism of vertical transmission of the dengue virus in mosquitoes. *CR Acad Sci III.* 1987;304:347-50.
38. **Chow V, Chan Y, Yong R, Lee K.** Monitoring of dengue viruses in field-caught *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* mosquitoes by a type-specific polymerase chain reaction and cycle sequencing. *Am Soc Trop Med Hyg.* 1998;58:578-86. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1998.58.578>
39. **Pan American Health Organization/World Health Organization.** State of the art in the prevention and control of dengue in the Americas. Meeting Report. Washington, D.C.: PAHO; 2014. p. 1-78.
40. **Rúa-Uribe G, Acosta CS, Londoño V, Sánchez J, Rojo R, Novoa BB.** Primera evidencia de *Aedes albopictus* (Skuse) (Diptera: Culicidae) en la ciudad de Medellín, Antioquia - Colombia. *Revista Facultad Nacional de Salud Pública Medellín.* 2011;5:89-98.
41. **Ibáñez-Bernal S, Briseño B, Mutebi JP, Argot E, Rodríguez G, Martínez-Campos C, et al.** First record in America of *Aedes albopictus* naturally infected with dengue virus during the 1995 outbreak at Reynosa, México. *Med Vet Entomol.* 1997;11:305-9. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2915.1997.tb00413.x>
42. **Thavara U, Siriyasatien P, Tawatsin A, Asavadachanukorn P, Anantapreecha S, Wongwanich R, et al.** Double infections of heteroserotypes of dengue viruses in field populations of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) and serological features of dengue viruses found in patients in southern Thailand. *Southeast Asian J Trop Med Public Health.* 2006;37:468-76.
43. **Rohani A, Asmaliza I, Zainah S, Lee H.** Detection of dengue virus from field-caught *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* adults and larvae. *Southeast Asian J Trop Med Public Health.* 1997;28:138-42.
44. **Thenmozhi V, Hiriyan J.** Natural vertical transmission of dengue virus in *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in Kerala, a southern Indian state. *Jpn J Infect Dis.* 2007;60:245-9.
45. **Bonizzoni M, Gasperi G, Chen X, James AA.** The invasive mosquito species *Aedes albopictus*: Current knowledge and future perspectives. *Trends Parasitol.* 2013;29:460-8. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2013.07.003>
46. **Paupy C, Delatte H, Bagny L, Corbel V, Fontenille D.** *Aedes albopictus*, an arbovirus vector: From the darkness to the light. *Microbes Infect.* 2009;11:1177-85. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2009.05.005>
47. **Rúa-Uribe GL, Suárez C, Rojo R.** Implicaciones epidemiológicas de *Aedes albopictus* (Skuse) en Colombia. *Revista Facultad Nacional de Salud Pública.* 2012;30:328-37.
48. **Olano VA, Matiz MI, Lenhart A, Cabezas L, Vargas SL, Jaramillo JF, et al.** Schools as potential risk sites for vector-borne disease transmission: Mosquito vectors in rural schools in two municipalities in Colombia. *J Am Mosq Control Assoc.* 2015;31:212-22. <https://doi.org/10.2987/moco-31-03-212-222.1>