



Identificación de especies del género Aedes (Diptera; Culicidae) y detección de infección por Arbovirus (CHIKV, DENV, MAYV, ZIKV) circulantes en tres municipios de Arauca, Colombia.

David Fernando Martínez Medina

Dirección

Juan David Ramírez González Ph.D.

Codirección

Diana Carolina Hernandez Castro Ph.D.

Trabajo presentado como requisito para optar por el título de Biólogo

Facultad de Ciencias Naturales. Pregrado en Biología. Universidad del Rosario Bogotá,
2020.

RESUMEN

La identificación de las especies de vectores y su infección natural mediante RT-PCR (reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa) son datos importantes para el control de la transmisión de las arbovirosis, lo cual se lleva a cabo principalmente en países como México y Brasil. Sin embargo, esta información para el oriente de Colombia es limitada. Por lo cual, el siguiente estudio tuvo como objetivo la identificación (morfológica y molecular) de las especies del género *Aedes* presentes en tres municipios (Saravena, Arauquita y Tame) del departamento de Arauca, Colombia. Así como, la detección de la infección por arbovirus (Dengue, Chikungunya, Zika y Mayaro), mediante la amplificación del material genético por RT-PCR. Los resultados muestran la coexistencia de *Ae. aegypti* y *Ae. albopictus* en la zona urbana de los municipios de Saravena y Arauquita, donde los individuos se encontraron infectados por Dengue (DENV-1) y Chikungunya (CHIKV). El arbovirus con mayor frecuencia es el DENV-1 con una tasa de infección de 24,3% (27/111) para *Ae. aegypti* y 39,7% (23/58) para *Ae. albopictus*. Seguido por CHIKV con una tasa de infección de 1,8% (2/111) para *Ae. aegypti* y 6,9% (4/58) para *Ae. albopictus*. Se obtuvo un 4,5% (5/111) de infección mixta por DENV-1 y CHIKV en la especie *Ae. aegypti* y no se detectó infección por Zika (ZIKV) y Mayaro (MAYV). Finalmente, el presente estudio propone el procesamiento individual de los insectos y no por pools para la detección de los arbovirus dado que de esta manera se obtiene una tasa de infección más acertada y se logra evidenciar las infecciones mixtas.

Palabras clave: Arbovirus, Dengue, Zika, Chikungunya, Mayaro, *Aedes*

ABSTRACT

The identification of the vector species and their natural infection are important data for the control of the transmission of arboviral infections. However, this information for the eastern part of Colombia is limited. Therefore, the following study aimed to identify (morphological and molecular) the species of the genus *Aedes* present in three municipalities (Saravena, Arauquita and Tame) in the department of Arauca, Colombia. As well as the detection of arboviral infection (Dengue, Chikungunya, Zika and Mayaro), by amplifying the genetic

material by RT-PCR (reverse transcriptase polymerase chain reaction). The results showed the coexistence of *Ae. aegypti* and *Ae. albopictus* in the urban area of the municipalities of Saravena and Arauquita, where the individuals were found infected by Dengue (DENV-1) and Chikungunya (CHIKV). The most frequently arbovirus was DENV-1 with an infection rate of 24.3% (27/111) for *Ae. aegypti* and 39.7% (23/58) for *Ae. albopictus*. Followed by CHIKV with an infection rate of 1.8% (2/111) for *Ae. aegypti* and 6.9% (4/58) for *Ae. albopictus*. A mixed infection of DENV-1 and CHIKV was obtained in 4.5% (5/111) in the species *Ae. aegypti* and Zika (ZIKV) and Mayaro (MAYV) infection were not detected. Finally, the present study proposes the individual processing of insects for the detection of arboviruses since in this way a more accurate infection rate is obtained and the mixed infections are evidenced.

KEY WORDS

Arbovirus, Dengue, Zika, Chikungunya, Mayaro, *Aedes*

INTRODUCCIÓN

Las arboviruses, son enfermedades transmitidas por artrópodos (insectos vectores), causadas por alrededor de 535 virus (arbovirus) y representan un importante impacto en la salud pública de Latinoamérica (Espinal et al., 2019; Shope & Meegan, 1997). Esto debido al aumento en su incidencia en los últimos años y los ciclos epidemiológicos que se presentan en la región (Villar, Rojas, Besada-Lombana & Sarti, 2015). Los virus responsables de las arbovirosis en Latinoamérica se encuentran clasificados principalmente en dos géneros. En el género *Flavivirus* (Familia Flaviviridae) se encuentran virus de importancia en salud pública como el Dengue (DENV) y Zika (ZIKV), mientras que en el género *Alphavirus* (Familia Togaviridae) se encuentran el virus Chikungunya (CHIKV), y el virus Mayaro (MAYV). El DENV es el arbovirus con mayor incidencia debido a la circulación simultánea de los cuatro serotipos en la región, donde el serotipo DENV-1 es el que presenta mayor prevalencia. El MAYV, causante de la fiebre del Mayaro, es una enfermedad con sintomatología muy similar a la del DENV. Desde su primer caso en 1954 en Trinidad, se ha

reportado brotes en la mayoría de países de Latinoamérica, sin embargo, en Colombia no se tiene reporte de su circulación (de la cruz et al., 2019; Azevedo et al., 2009).

La transmisión vectorial de los arbovirus comprende principalmente un ciclo denominado enzoótico donde el virus circula entre el vector y los reservorios en zonas selváticas. Sin embargo, este ciclo puede ser modificado por dos factores; (i) la intrusión del humano y/o (ii) la adaptación del vector a zonas urbanas y periurbanas (Weaver & Barrett, 2004). Dípteros del género *Aedes*, se han encontrado en zonas de altos índices de arbovirosis, por lo cual se ha asociado su presencia con un ciclo de infección en zonas urbanas (Beaty et al., 2015). Dentro de este género, hay alrededor de 190 especies, sin embargo, las especies *Ae. aegypti* y *Ae. albopictus* son de gran importancia por su capacidad vectorial de CHIKV, DENV, ZIKV y MAYV con una eficiencia de transmisión del alrededor del 90% para las dos especies de insectos (Ramasamy et al., 2011; Lounibos & Kramer, 2016; Freitas, 2010; Vega-Rúa et al., 2014).

La detección directa de arbovirus tanto en humanos como en vectores, se realiza mediante la retrotranscripción y amplificación por PCR en tiempo real (RT-PCR) de genes específicos para cada arbovirus. Las ventajas de la RT-PCR son: (i) ausencia de reacciones cruzadas entre los arbovirus detectados y (ii) permite detectar los diferentes serotipos y/o genotipos (Roehrig & Lanciotti, 2009; Ferreira-de-Brito et al., 2016). Por último, la detección positiva del virus y la frecuencia de infección en vectores es reportada en tasa de infección mínima (MIR), definida como la relación entre pooles positivos y el número total de individuos por 1000 individuos (Gu, Lampman & Novak, 2004). Sin embargo, para tener una estimación correcta es necesario obtener una muestra ≥ 1000 individuos y tamaños de pooles pequeños. Por lo cual, en un muestreo menor, no es posible asegurar la correcta estimación de la tasa de infección y no existen estudios con metodologías donde se haga su búsqueda por insectos individualmente.

En cuanto a la distribución de las arbovirosis en Colombia estas coinciden con la presencia de *Ae. aegypti* y *Ae. albopictus*. La especie *Ae. aegypti* presenta una mayor distribución geográfica con 128 reportes mientras que para *Ae. albopictus* solo se han realizado 7; cabe

resaltar que estos reportes solo se han hecho a partir de identificación morfológica (Zamora-Delgado, Castaño & Hoyos-López, 2015; Kraemer et al. 2015). Sin embargo, los reportes de Antioquia y Quindío son los únicos respaldados por el marcador molecular barcode COI (Citocromo c Oxidasa I) (Carvajal et al., 2016; Gómez-Palacio et al., 2017; Camacho-Gómez & Zuleta, 2019; Ortiz-Canamejoy & Villota, 2018). Se ha reportado la infección por el serotipo DEN-1 en mayor proporción en individuos tanto de la especie *Ae. aegypti* como *Ae. albopictus* recolectados en los departamentos de Cundinamarca, Antioquia y Córdoba (Hoyos-López et al., 2016; Hoyos-López et al., 2019; Gómez-Palacio et al., 2017). Adicionalmente, para *Ae. aegypti* el DENV presenta un MIR de 4 a 6 individuos infectados y para ZIKV es de 36,9 por 1000 individuos totales. Por otro lado, para *Ae. albopictus* el ZIKV presenta un MIR de 21,7 (Calle-Tobón et al., 2020). En cuanto a CHIKV y MAYV no es posible obtener el MIR debido a la ausencia de estudios.

El estudio y abordaje de las arbovirosis, se ha centrado en realizar su detección principalmente en huéspedes humanos, por lo tanto, la información sobre la infección natural en vectores es limitada. En Colombia y específicamente en el departamento de Arauca, los estudios enfocados en la infección natural por arbovirus en vectores son muy pocos. Es de gran importancia, enfocarse tanto en la distribución geográfica como en la infección viral de los vectores circulantes en esta zona del país, puesto que es una de las zonas con mayor incidencia de DENV, CHIKV y ZIKV. Adicionalmente, es de gran importancia incluir en este estudio, la identificación de MAYV que, aunque no se ha reportado en el país, tiene un potencial importante para generar la fiebre de Mayaro en la zona oriental, dada su presencia en las zonas fronterizas con Venezuela (Lorenz et al., 2019). Por lo tanto, el presente estudio tiene como objetivo identificar las especies de *Aedes* circulantes en tres municipios del departamento de Arauca, Colombia, así como, determinar la infección por DENV-1, CHIKV, ZIKV y MAYV.

MATERIALES Y MÉTODOS

Lugar y Captura de Insectos

Los insectos fueron capturados en el departamento de Arauca en los municipios de Saravena ($6^{\circ}57'17''\text{N}$, $71^{\circ}52'36''\text{O}$), Arauquita ($7^{\circ}01'34''\text{N}$, $71^{\circ}25'38''\text{O}$) y Tame ($6^{\circ}27'30''\text{N}$, $71^{\circ}44'41''\text{O}$) (Figura 1). La recolección, se realizó en la zona urbana de los tres municipios, sin embargo, en el municipio de Saravena también se capturaron individuos en zona rural. Se llevaron a cabo dos muestreos, uno en 2018 y otro en 2019, en cada uno de estos se instalaron trampas mosquitaire durante tres meses consecutivos (Abril-Mayo-Junio). En cada trampa, se eligieron solo las hembras del género *Aedes* y posteriormente se formaron los pools según la identificación morfológica.

Los insectos o “pools” formados, fueron almacenados en RNAlater Invitrogen® (Salehi & Najafi, 2014), en frascos marcados con las coordenadas e información sobre la vivienda y/o el sitio de recolección y transportado al laboratorio de Microbiología del grupo de investigación microbiológica de la Universidad de Rosario (GIMUR).

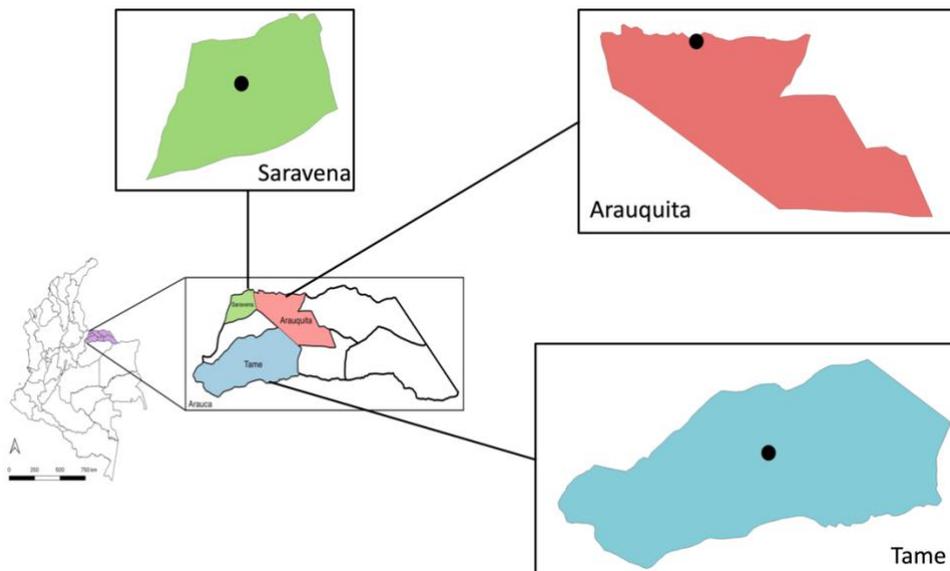


Figura 1. Municipios donde se realizó la Captura; Saravena (verde), Arauquita (Rosa) y Tame (Azul), en el departamento de Arauca (morado), Colombia. El punto negro indica la zona urbana donde se realizó la captura de individuos.

Identificación morfológica y molecular de las especies de *Aedes*

La identificación morfológica de los individuos del género de *Aedes* se realizó usando la clave propuesta por Forattini, (1965) para identificar los insectos hasta género y la revisión taxonómica de Cova-Garcia et al. (1966) para identificar las especies. La identificación molecular de las especies se realizó mediante la amplificación del fragmento del gen COI (Citocromo c Oxidasa I) asociado con el ADN barcode. Cabe resaltar que la amplificación se realizó a partir del ARN del individuo debido a que este era necesario para la detección de los arbovirus.

Se llevó a cabo la extracción de ARN a partir de cada individuo con el kit Quick-RNATissue/Insect Microprep Kit (Zymo, #R2030), siguiendo las instrucciones recomendadas por el fabricante. Posteriormente, a partir de dicho ARN se llevó a cabo una RT-PCR One Step para generar ADNc (ADN complementario) y amplificar el gen COI. Se preparó la siguiente mezcla de reacción: 5 μ L de agua, 1 μ L de cada iniciador (forward y reverse a 10 μ M), 4 μ L Master Mix y 5 μ L de ADN. Se utilizaron los iniciadores LCO1490 (5'-GGT CAA CAA ATC ATA AAG ATA TTG G-3') y HCO2198 (5'-TAA ACT TCA GGG TGA CCA AAA AAT CA-3') (Joyce et al., 2018). El perfil térmico usado fue: un ciclo para la activación de la transcriptasa inversa de 50°C por 10 minutos, seguido por una denaturación inicial a 95°C por 1 minuto, luego 45 ciclos de 94°C por 10 seg, 60°C por 1 minuto y extensión final a 72°C por 10 minutos.

La amplificación del fragmento del gen se determinó mediante electroforesis en gel de agarosa al 2.5% en TBE 1x buffer, usando como agente intercalante SYBR® Safe (Invitrogen®, Carlsbad, CA, USA), al observar una banda de ~650 pares de bases (pb). Posteriormente, aquellas muestras donde se observó la banda correspondiente al fragmento del gen COI se secuenció por el método de sanger.

Análisis de secuencias del gen COI (Barcode)

El alineamiento y limpieza de secuencias se realizó en el software Seqman (Lasergene) y la secuencia de nucleótidos fue comparada con la base de datos Nucleotide Blast. (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). El análisis completo de las secuencias se llevó a

cabo en el software MEGA X 10.1. Las secuencias fueron alineadas utilizando el algoritmo MUSCLE en el software previamente mencionado. El modelo de sustitución que mejor explicó los datos para el gen mitocondrial COI (Barcode) fue Jukes-Cantor (AIC= 1986.637). La reconstrucción filogenética se estableció mediante el método de estimación de Máxima Verosimilitud (MV) y el soporte de los nodos fue establecido a partir de 5.000 réplicas de bootstrap. El grupo externo para el árbol filogenético fue *Culex spinosus* (KM593059.1).

DetECCIÓN DE ARBOVIRUS

La detección de cada uno de los arbovirus (DENV-1/CHIKV/ZIKV/MAYV), se realizó en las muestras de los individuos recolectados mediante qRT-PCR One Step utilizando los iniciadores y sondas Taqman correspondientes (Tabla 1). La mezcla de qRT-PCR para DENV, CHIKV y ZIKV (por muestra) contiene: 2.5 µL de agua, 1 µL de cada primer (forward y reverse a 50 µM), 0.5 µL de la sonda (25 µM), 10 µL Master Mix y 5 µL de ARN. Para la mezcla de MAYV se usó el protocolo recomendado por la OMS (WHO, 2020). El perfil térmico usado fue: un ciclo para la activación de la transcriptasa inversa de 50°C por 10 minutos, seguido por una denaturación inicial a 95°C por 1 minuto, luego 40 ciclos de 95°C por 15 segundos, 60°C por 1 minuto y extensión final a 72°C por 10 minutos. Se usó ARN viral de cada arbovirus como control positivo, el cual fue facilitado por el grupo de virología del Instituto Nacional de Salud. Finalmente, la frecuencia de infección fue expresada como la tasa de infección y es calculada en cada especie por cada arbovirus mediante la fórmula 1.

$$TI = \frac{N^{\circ} \text{ de individuos infectados}}{N^{\circ} \text{ de individuos totales}}$$

Fórmula 1. Tasa de infección.

Tabla 1. Iniciadores y sondas específicas para cada arbovirus.

Virus	Iniciadores	Gen (Referencia)
CHIKV	F: TCACTCCCTGTTGGACTTGATAGA	

	R: TTGACGAACAGAGTTAGGAACATACC	NS (Proteína no estructural) (Lanciotti et al., 2007)
DENV	DENV-1 F: CAAAAGGAAGTCGYGCAATA R: CTGAGTGAATTCTCTCTGCTRAAC S: [FAM]-CATGTGGYTGGGAGCRCGC	NS5 (Proteína no estructural 5) (Santiago et al., 2013)
MAYV	F: GTGGTCGCACAGTGAATCTTTC R: CAAATGTCCACCAGGCGAAG S:FAM-ATGGTGGTAGGCTATCCGACAGGTC-carboxytetramethylrhodamine [TAMRA]	E2 (Proteína de Envoltura 2) (Long et al., 2011)
ZIKV	F: AARTACACATACCARAACAAAGTG GT R: TCCRCTCCCYCTYTGGTCTTG´ S: FAM-CTYAGACCAGCTGAAR-BBQ	NS5 (Proteína no estructural 5) (Faye, Diallo, Diallo, Weidmann, & Sall, 2013)

Análisis estadísticos

Se realizaron análisis descriptivos de la frecuencia de cada especie del vector, e infección natural por cada uno de los arbovirus en términos de porcentajes. Adicional a esto, para cuantificar la concordancia entre el método de identificación de especie por clave taxonómica y marcador molecular se calculó el índice kappa (Cook, 2005).

Se realizó una regresión logística, incluyendo el intercepto, para estimar el riesgo de infección con los Arbovirus (OR, IC 95%) de acuerdo con la especie del vector, municipio y zona de recolección. Las variables especie y zona de recolección se transformaron en dummies (1/0) utilizando la especie *Ae. albopictus* y la zona rural como referentes (0). Preliminarmente se ejecutó un modelo de efectos principales para identificar variables potencialmente asociadas con el desenlace establecido y un valor $p < 0.05$ como significativo. Posteriormente se ejecutó un modelo de interacción de segundo nivel, paso a paso (stepwise), que incluía interacciones entre la especie del vector con la zona o municipio de recolección y se utilizó el criterio de Akaike más bajo para seleccionar el mejor modelo.

RESULTADOS

Identificación morfológica y molecular de las especies de *Aedes*

En los dos muestreos realizados se capturaron 169 ejemplares del género *Aedes*, de los cuales el 68% (n=115) fueron recolectados en el municipio de Saravena, el 15,4% (n=26) en el municipio de Arauquita y el 16,6% (n=28) en Tame. Se observaron diferencias en el número de individuos identificados como *Ae. aegypti* y *Ae. albopictus* entre los métodos de identificación molecular y morfológico (Figura 2). Adicionalmente, de acuerdo con el índice kappa obtenido ($k=0,7643$) la concordancia entre los métodos de identificación (clave taxonómica vs. Molecular) de especie fue considerada como buena (Cook, 2005). Se evidenciaron incongruencias en la identificación de 16 individuos, donde inicialmente se identificaron mediante morfología como *Ae. aegypti* y el análisis del marcador molecular indico que son de la especie *Ae. albopictus*.

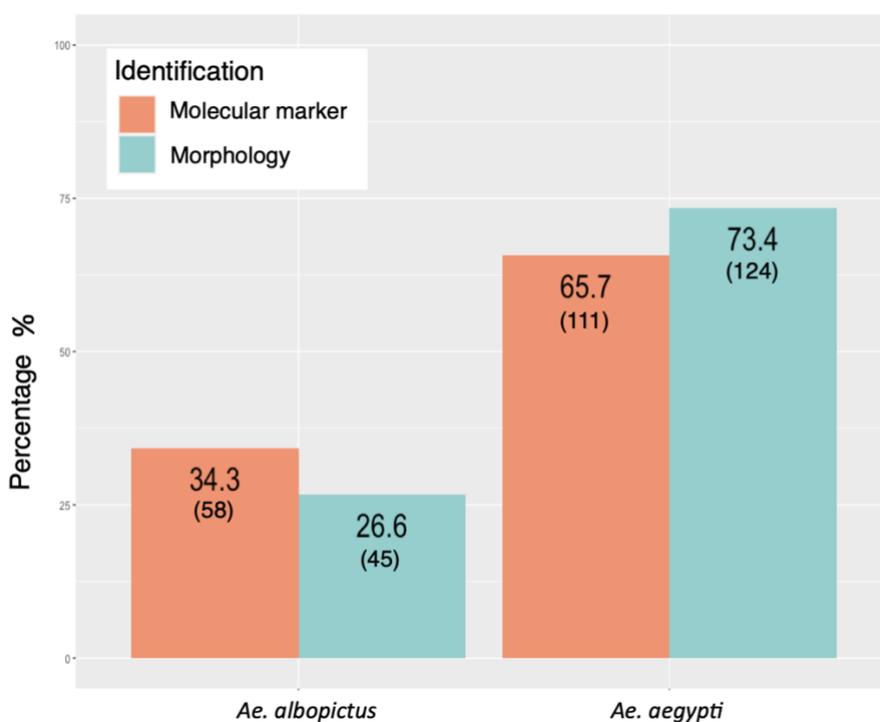


Figura 2. Porcentaje de individuos *Ae. albopictus* y *Ae. aegypti* identificados por morfología (Verde) y marcador molecular (Naranja).

Análisis de secuencias del gen COI (Barcode)

Se obtuvo un fragmento de 338 pb para el gen COI y en la topología construida los individuos constituyen dos clados agrupados por especie que corresponden a *Ae. aegypti* (bootstrap = 98, Figura 3) y *Ae. albopictus* (bootstrap = 99, Figura 3) y entre las secuencias de las dos especies se observó un cambio en 56 pb. Adicionalmente la especie del género *Culex* (Outgrup) formo un clado independiente a las especies del género *Aedes*.

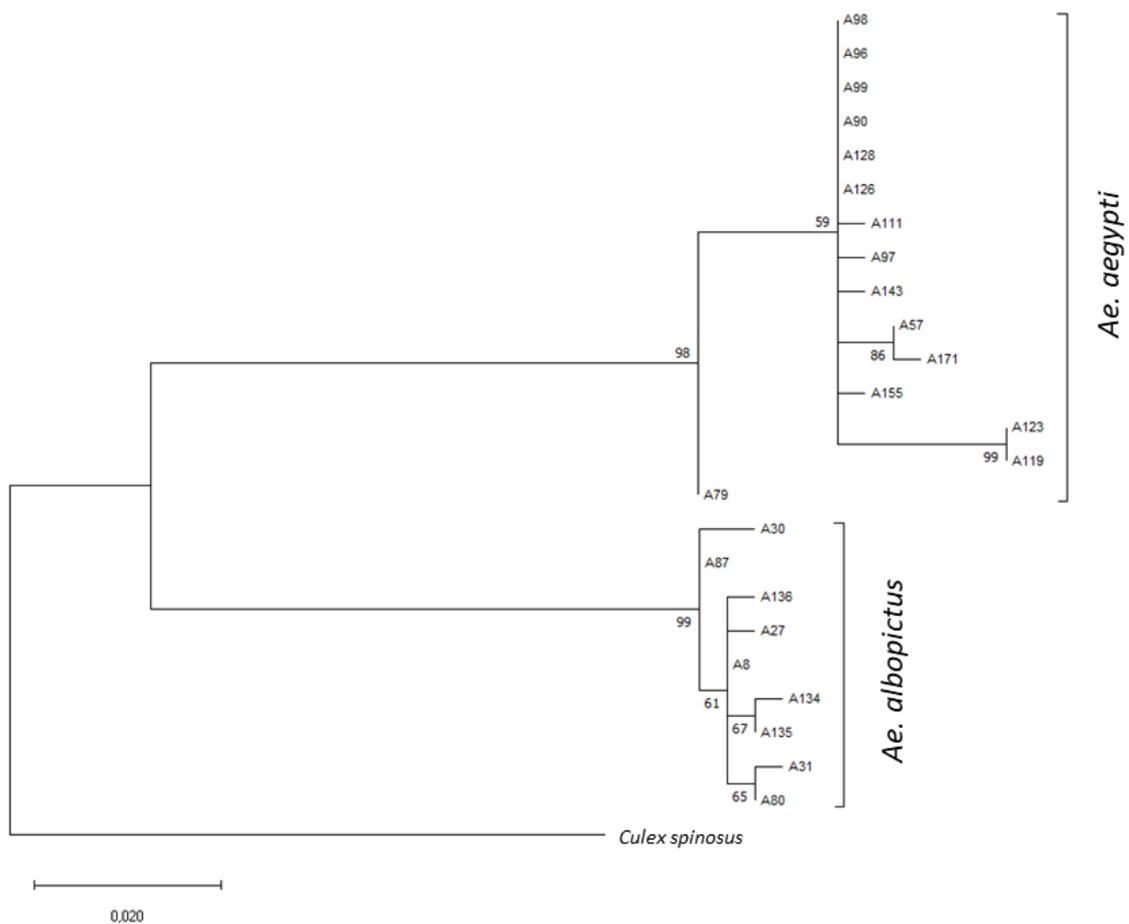


Figura 3. Árbol filogenético de las especies *Ae. aegypti* y *Ae. albopictus* construido con ML para el gen COI. En cada nodo se indica el soporte (bootstrap). Los nodos que carecen de valor presentaron un soporte <50.

Distribución geográfica de las especies *Ae. aegypti* y *Ae. albopictus*

La tabla 2 muestra la información con respecto a la frecuencia de individuos *Ae. aegypti* (n=111) y *Ae. albopictus* (n=58) por zona y municipio de captura. La especie *Ae. aegypti* se encuentra presente en los tres municipios y solo en zonas urbanas, el 64,9% (72/111) pertenecen al municipio de Saravena. Se observó la presencia de *Ae. albopictus*, solo en los municipios de Saravena y Arauquita en zonas tanto urbanas como rurales (Figura 3). Teniendo en cuenta lo anterior, se puede evidenciar la presencia de individuos de las dos especies en la zona urbana del municipio de Saravena y Arauquita.

Tabla 2. Número de *Ae. aegypti* y *Ae. albopictus* capturados por año, zona, municipio e infectados por arbovirus.

Captura	<i>Ae. aegypti</i> n (%)	<i>Ae. albopictus</i> n (%)	Total
	111 (65,7)	58 (34,3)	169
Año			
2018	51 (49)	53 (51)	104
2019	60 (92.3)	5 (7.7)	65
Zona			
Rural	0	37 (100)	37
Urbana	111 (84.1)	21 (15.9)	132
Municipio			
Saravena	72 (62.6)	43 (37.4)	115
Arauquita	11 (42.3)	15 (57.7)	26
Tame	28 (100)	0	28
Tasa de infección con Arbovirus			
DENV-1	27 (24.3)	23 (39.7)	50 (29.6)
CHIKV	2 (33.3)	4 (66.7)	6 (3.5)
Mixta (DENV-1 y CHIKV)	5 (100)		5 (3)
No infectados	77 (71.3)	31 (28.7)	108 (63,9)

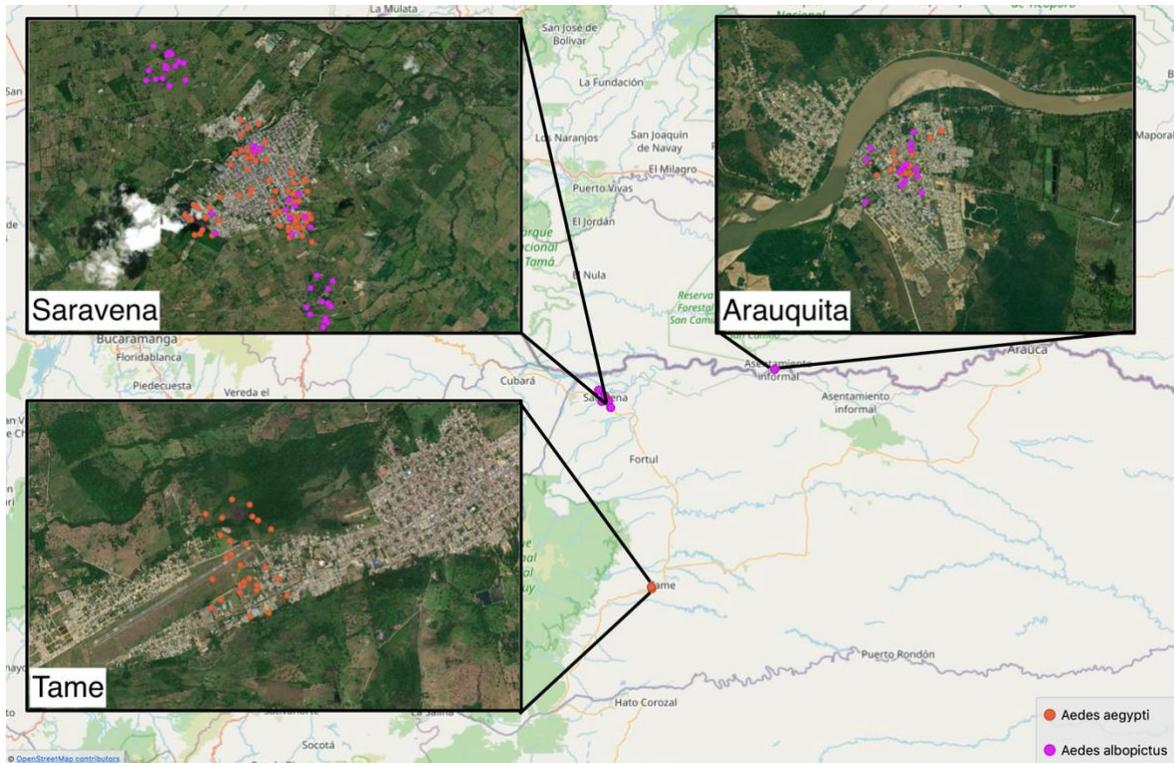


Figura 4. Localización geográfica de *A. aegypti* (Naranja) y *Ae. albopictus* (Morado) recolectados en los municipios de Saravena, Arauquita y Tame.

Infección natural por arbovirus

De los 169 individuos recolectados del género *Aedes*, encontramos que la tasa general de infección por arbovirus fue del 36,1% (61/169). El arbovirus con mayor frecuencia en la población fue DENV-1 que se encontró en el 82% (50/61) de los individuos infectados, mientras que el 9,8% (6/61) se encontraron infectados por CHIKV y ninguno de los individuos estaba infectado por ZIKV o MAYV. Adicional a esto, se encontró una frecuencia de 4,5% (5/111) de infección mixta por los arbovirus DENV-1 y CHIKV en la especie *A. aegypti*. En la tabla 2, se encuentra las tasas de infección por arbovirus en cada especie, donde se puede observar una mayor tasa de infección en los individuos de la especie *A. albopictus*. Los resultados de la regresión logística mostraron que en el municipio de Arauquita es 7 veces más probable encontrar individuos infectados (OR=7;IC 95%=1,890–25,932; p=0,004) en comparación con Tame. Por otro lado, en el municipio de Saravena se observó que es 3,6

más probable encontrar individuos infectados respecto a Tame (OR=3,6;IC 95%=1,165–11,025; p=0,026) (Figura 4).

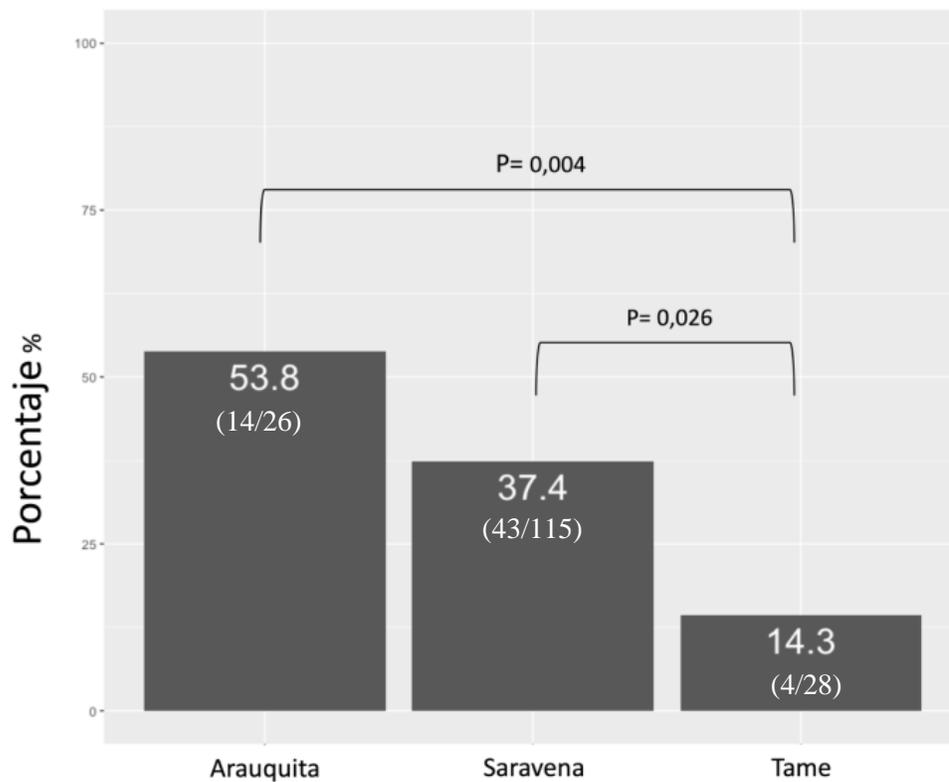


Figura 5. Porcentaje de individuos infectados por los municipios de Arauquita, Saravena y Tame.

DISCUSIÓN

La clasificación de *Ae. aegypti* y *Ae. albopictus*, se realiza principalmente mediante identificación morfológica (Kraemer et al., 2015) y los reportes que usan identificación molecular son pocos (Zamora-Delgado, Castaño & Hoyos-López, 2015; Atencia et al., 2018). Los resultados aquí expuestos muestran una buena concordancia ($k=0,7643$) entre los dos métodos de identificación (Cook, 2005), no obstante, se logra evidenciar una deficiencia en la identificación mediante morfología (Figura 2). El principal carácter que permite la diferenciación entre estas dos especies es el patrón en el scutum (esclerito de mesotórax). La especie *Ae. albopictus* presenta una línea media longitudinal de color blanco y *Ae. aegypti* dos líneas curvas de color blanco en cada lado exterior del scutum. Se ha descrito que estos

patrones son susceptibles a difuminarse durante el procesamiento de almacenamiento de los insectos (Patsoula et al., 2006), Teniendo en cuenta lo mencionado, puede existir el riesgo de una incorrecta identificación morfológica y cualquier error en este proceso tiene efecto negativo en los estudios que concluyen sobre la biología y la capacidad vectorial de cada una de estas especies de insectos.

Estudios enfocados en la distribución de *Ae. aegypti* y *Ae. albopictus*, concluyen que su presencia se debe a la interacción de diferentes factores bióticos y abióticos. (Lozano-Fuentes et al., 2012; Liang et al., 2019). Esta interacción se puede evidenciar en los modelos que han determinado una asociación entre el uso del suelo con la presencia de *Ae. aegypti* y *Ae. albopictus*, así como de la prevalencia de las arbovirosis Las principales actividades que tienen riesgo son los asentamientos humanos, horticultura y ganadería (Cheong et al., 2014), lo que se debe principalmente a que estas actividades generan micro-habitats, favoreciendo la reproducción del vector (Sarfraz et al., 2012). En concordancia con lo anterior, se evidenció la coexistencia de las especies *Ae. aegypti* y *Ae. albopictus* en zonas urbanas de los municipios de Saravena y Arauquita (Figura 4). lo cual se ha evidenciado en países como Brasil y Panamá (Li et al., 2014; Whiteman et al., 2019). Por lo cual, la coexistencia de estas dos especies en una misma zona genera un riesgo a nivel de salud pública, dado que son dos vectores contribuyendo en la transmisión de los arbovirus en el ciclo urbano de una misma zona.

Por otra parte, se encontró en mayor frecuencia los individuos de la especie *Ae. aegypti* en el municipio de Saravena, mientras que, en el municipio de Arauquita, se observó una mayor frecuencia de individuos de la especie *Ae. albopictus* (Tabla 2). Esto puede estar asociado a los diferentes usos del suelo en cada municipio, dado que en Arauquita hay una alta disponibilidad de cuerpos de agua naturales debido a la presencia del río Arauca en la zona norte del municipio. Lo anterior, beneficia la reproducción de *Ae. albopictus*, dado que esta especie tiene preferencias por estos cuerpos de agua en comparación con *Ae. aegypti* (Claeys et al., 2016). Este fenómeno descrito se ha reportado previamente en Vietnam y Brasil (Higa et al., 2010; Barbosa et al., 2020), donde en este último se realizó un análisis espacial que permitió determinar una asociación entre la presencia de los vectores dependiendo del tipo

de cuerpos de agua (Lozano-Fuentes et al., 2012; Liang et al., 2019). Teniendo en cuenta lo mencionado, cabe la posibilidad que en los municipios estén interactuando otros factores que influyan en la distribución geográfica de estas especies.

Diferentes modelos han evidenciado que la movilidad humana es un factor importante en el aumento en la incidencia del DENV, aun en distancias cortas, es decir entre ciudades (Massaro, Kondor & Ratti, 2019; Barmak, Dorso & Otero, 2016; Zhu et al., 2019). En concordancia con los resultados obtenidos a partir de la regresión logística muestran que en el municipio de Arauquita hay mayor riesgo de encontrar individuos infectados por los arbovirus (Figura 5). Este municipio se encuentra en una zona fronteriza con Venezuela, por ende, hay un alto movimiento de hospederos que pueden estar contribuyendo en que el virus se mantenga en estas zonas.

El arbovirus con mayor frecuencia en la población de individuos infectados fue DENV-1 con un 62% (50/61) (Tabla 2). El serotipo DENV-1 también se ha detectado con mayor frecuencia que otros arbovirus en Indonesia, México, Cuba, Brasil y Colombia (Rahayu et al., 2019; Garcia-Rejon et al., 2018; Gutiérrez-Bugallo et al., 2018; Eiras et al., 2018; Velandia-Romero et al. 2017). La elevada frecuencia de este arbovirus puede deberse a que la transmisión en el ciclo urbano del DENV está dada por el nivel de viremia de los hospederos, dado que los individuos al inicio de la infección presentan altas tasas de viremia (Duong et al., 2015; Martínez-Vega et al., 2015). Lo mencionado anteriormente, concuerda con los resultados obtenidos en este estudio dado que en el departamento de Arauca el DENV-1 es el arbovirus con mayor prevalencia (BES-22, 2020). A partir de lo mencionado, se evidencia la necesidad de realizar una vigilancia entomo-virológica de manera complementaria a la búsqueda activa de casos en humanos. Esto con el fin de tener un panorama completo de la transmisión urbana de los arbovirus.

Los resultados expuestos en este estudio muestran una tasa de infección más alta por DENV-1 y CHIKV en la especie *Ae. albopictus* (Tabla 2) en comparación con *Ae. aegypti*. Estos valores no concuerdan con lo reportado previamente, dado que los valores de MIR en *Ae. aegypti* son más altos. Sin embargo, esto si se ha evidenciado de manera experimental, donde

se comprobó que *Ae. albopictus* parece ser un vector más susceptible a la infección que *Ae. aegypti*. Esto debido a que las tasas de diseminación de los arbovirus fueron más altas en *Ae. albopictus* (Turell et al., 1992). En cuanto a la falta de infección natural por ZIKV, esto se debe al bajo número de casos reportados en humanos en el departamento de Arauca en los últimos dos años (BES-22, 2020). Lo cual confirma que este arbovirus no se encuentra circulando en el ciclo urbano de los tres municipios muestreados.

Por otro lado, la ausencia de individuos infectados por MAYV puede deberse a que los insectos procesados en este estudio hacen parte del ciclo urbano y no hay estudios que demuestren la eficiencia de transmisión del virus en este ciclo. Sin embargo, en el estudio de Pereira et al. (2020) se demuestra que bajo condiciones de laboratorio *Ae. aegypti* y *Ae. albopictus* tienen la capacidad de infectarse y potencial de transmitir el genotipo D de MAYV. Así mismo, es posible infectar mosquitos con el virus a partir de saliva de individuos que dieron negativos inicialmente. Concluyendo que para que se dé la infección es necesario una carga viral baja la cual no es posible detectar mediante la PCR y esto se puede ver reflejado a su vez en los valores de MIR de 0.4 (95% CI=0.0–1.4) que se reportan para las especies (Maia et al., 2019). Es por esto que diferentes estudios proponen técnicas de enriquecimiento viral que permiten aumentar en proporción las secuencias del virus, lo cual fue corroborado mediante secuenciación de siguiente generación (NGS) (Hall et al., 2014). Dado lo anterior, es importante que estudios futuros implementen técnicas de enriquecimiento viral que permitan la detección de los virus aun en concentraciones bajas.

La coinfección natural entre DENV-2 y CHIKV se ha reportado previamente en la especie *Ae. albopictus*, donde se logró asociar con la circulación simultánea de estos dos arbovirus durante un brote de dengue en África Central (Caron et al., 2012). En el presente estudio, se encontró una tasa de coinfección mixta de DENV-1 y CHIKV del 4,5% (5/111) en la especie *Ae. aegypti*. Lo que muestra una circulación simultánea de estos dos arbovirus, que puede desencadenar en la coinfección en humanos. Donde un aumento en los casos de coinfección llevaría a la rápida evolución genética del virus (Caron et al., 2012). El procesamiento de los individuos mediante pools no nos permitiría evidenciar la tasa de infecciones mixtas (Walter, Hildreth & Beaty, 2018; Gu, Lampman & Novak, 2004). Es por esto, la gran

importancia de realizar la vigilancia de los arbovirus en el vector de manera individual, dado que se estarían proporcionando datos erróneos de la infección natural por los arbovirus en cada uno de los vectores.

El presente estudio reporta por primera vez en Colombia la infección natural de CHIKV en *Ae. aegypti* y *Ae. albopictus*, donde se encontró una mayor tasa de infección en esta última especie. Lo cual deja en evidencia la susceptibilidad de esta especie a la infección por los arbovirus. Además, se encontró que DENV-1 es el arbovirus con mayor frecuencia en los individuos recolectados, lo que puede estar asociado a diferentes factores como la transmisión transovarica del vector y hospederos infectados con viremias altas que pueden mantener la contante transmisión del arbovirus. Se propone expresar los datos de infección natural por medio de tasas de infección con el fin de obtener un valor por individuo sobre la infección por los arbovirus . Por otro lado, se logra evidenciar la coexistencia de *Ae. aegypti* y *Ae. albopictus* en zonas urbanas de Saravena y Arauquita. Esta coexistencia puede explicarse por los diferentes usos del suelo en los municipios y la disponibilidad de cuerpos de agua que permiten la correcta reproducción y desarrollo de los vectores.

Es importante destacar algunas limitaciones del estudio, entre ellas la falta de detección de los serotipos DENV-2, -3 y -4, ya que es importante determinar su circulación en el departamento para determinar el comportamiento general de DENV. Finalmente, en futuros estudios es importante evaluar una asociación entre la variabilidad genética del vector y el arbovirus con la susceptibilidad a la infección para obtener más información sobre el ciclo urbano de estas enfermedades y generar programas de control.

Agradecimientos

Agradecemos a la Dirección de Investigación e Innovación de la Universidad del Rosario.

REFERENCIAS

Atencia, M. C., Pérez, M. D. J., Caldera, S. M., Jaramillo, M. C., & Bejarano, E. E. (2018). Genetic variability of *Aedes aegypti* in the department of Sucre, Colombia, by analysis of the nucleotide sequence of the mitochondrial ND4 gene. *Biomédica*, 38(2), 267-276.

Azevedo, R. S., Silva, E. V., Carvalho, V. L., Rodrigues, S. G., Neto, J. P. N., Monteiro, H. A., ... & Vasconcelos, P. F. (2009). Mayaro fever virus, Brazilian amazon. *Emerging infectious diseases*, 15(11), 1830.

Barbosa, R. M. R., Melo-Santos, M. A. V. D., Silveira Jr, J. C., Silva-Filha, M. H. N. L., Souza, W. V., Oliveira, C. M. F. D., ... & Nakazawa, M. M. (2020). Infestation of an endemic arbovirus area by sympatric populations of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 115.

Barmak, D. H., Dorso, C. O., & Otero, M. (2016). Modelling dengue epidemic spreading with human mobility. *Physica A: Statistical Mechanics and its Applications*, 447, 129-140.

Beaty, B. J., Black, W. C., Eisen, L., Flores, A. E., García-Rejón, J. E., Loroño-Pino, M., & Saavedra-Rodriguez, K. (2016). The intensifying storm: Domestication of *Aedes aegypti*, urbanization of arboviruses, and emerging insecticide resistance. In *Global Health Impacts of Vector-Borne Diseases: Workshop Summary*, National Academies Press.

Boletín Epidemiológico Semanal (BES) Semana Epidemiológica 22, 24 al 30 de mayo (2020). Obtenido de: https://www.ins.gov.co/buscador-eventos/BoletinEpidemiologico/2020_Bolet%C3%ADn_epidemiol%C3%B3gico_semana%2022.pdf

Bracco, J. E., Capurro, M. L., Lourenço-de-Oliveira, R., & Sallum, M. A. M. (2007). Genetic variability of *Aedes aegypti* in the Americas using a mitochondrial gene: evidence of multiple introductions. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 102(5), 573-580.

Caldera, S. M., Jaramillo, M. C., Cochero, S., Pérez Doria, A., & Bejarano, E. E. (2019). Diferencias genéticas entre poblaciones de *Aedes aegypti* de municipios del norte de Colombia, con baja y alta incidencia de dengue. *Revista*.

Camacho-Gómez, M., & Zuleta, L. P. (2019). Primer reporte de *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Skuse) en la Orinoquía colombiana. *Biomédica*, 39(4). Camacho-Gómez & Zuleta, 2019

Calle-Tobón, A., Pérez-Pérez, J., Rojo, R., Rojas-Montoya, W., Triana-Chavez, O., Rúa-Uribe, G., & Gómez-Palacio, A. (2020). Surveillance of Zika virus in field-caught *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* suggests important role of male mosquitoes in viral populations maintenance in Medellín, Colombia. *Infection, Genetics and Evolution*, 104434.

Caron, M., Paupy, C., Grard, G., Becquart, P., Mombo, I., Nso, B. B. B., ... & Leroy, E. M. (2012). Recent introduction and rapid dissemination of Chikungunya virus and Dengue virus serotype 2 associated with human and mosquito coinfections in Gabon, central Africa. *Clinical infectious diseases*, 55(6), e45-e53.

Carvajal, J. J., Honorio, N. A., Díaz, S. P., Ruiz, E. R., Asprilla, J., Ardila, S., & Parra-Henao, G. (2016). Detección de *Aedes albopictus* (Skuse)(Diptera: Culicidae) en el municipio de Istmina, Chocó, Colombia. *Biomédica*, 36(3), 438-446.

Cheong, Y. L., Leitão, P. J., & Lakes, T. (2014). Assessment of land use factors associated with dengue cases in Malaysia using Boosted Regression Trees. *Spatial and spatio-temporal epidemiology*, 10, 75-84.

Claeys, C., Robles, C., Bertaudiere-Montes, V., Deschamps-Cottin, M., Megnifo, H. T., Pelagie-Moutenda, R., ... & Bravet, P. (2016). Socio-ecological factors contributing to the exposure of human populations to mosquito bites that transmit dengue fever, chikungunya and zika viruses: a comparison between mainland France and the French Antilles. *Environnement, Risques & Santé*, 15(4), 318-325.

Cook, R. J. (2005). Kappa. *Encyclopedia of biostatistics*, 4.

Cova-Garcia, P., Sutil, E., & Rausseo, J. A. (1966). Mosquitos (Culicinos) de Venezuela: Tomo I and Tomo II. *Ministerio de Sanidad y Asistencia Social, Caracas*.

de la Cruz, C. H., Martínez, S. L. A., Failoc-Rojas, V. E., & Aguilar-Gamboa, F. R. (2019). Momento de considerar otras arbovirosis luego del virus mayaro. *Revista Cubana de Medicina General Integral*, 35(2).

Duong, V., Lambrechts, L., Paul, R. E., Ly, S., Lay, R. S., Long, K. C., ... & Buchy, P. (2015). Asymptomatic humans transmit dengue virus to mosquitoes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(47), 14688-14693.

Eiras, A. E., Pires, S. F., Staunton, K. M., Paixão, K. S., Resende, M. C., Silva, H. A., ... & Ritchie, S. A. (2018). A high-risk Zika and dengue transmission hub: virus detections in mosquitoes at a Brazilian university campus. *Parasites & vectors*, 11(1), 359.

Espinal, M. A., Andrus, J. K., Jauregui, B., Hull Waterman, S., Morens, D. M., Santos, J. I., ... & Olson, D. (2019). Arbovirosis emergentes y reemergentes transmitidas por Aedes en la Región de las Américas: implicaciones en materia de políticas de salud. *Rev Panam Salud Publica*; 43, may 2019.

Faye, O., Diallo, D., Diallo, M., Weidmann, M., & Sall, A. A. (2013). Quantitative real-time PCR detection of Zika virus and evaluation with field-caught mosquitoes. *Virology*, 10, 311. doi:10.1186/1743-422x-10-311

Failloux, A. B., Vazeille, M., & Rodhain, F. (2002). Geographic genetic variation in populations of the dengue virus vector *Aedes aegypti*. *Journal of Molecular Evolution*, 55(6), 653-663.

Ferreira-de-Brito, A., Ribeiro, I. P., Miranda, R. M. D., Fernandes, R. S., Campos, S. S., Silva, K. A. B. D., ... & Lourenço-de-Oliveira, R. (2016). First detection of natural infection of *Aedes aegypti* with Zika virus in Brazil and throughout South America. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, *111*(10), 655-658.

Freitas, R. M. D. (2010). A review on the ecological determinants of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) vectorial capacity.

Forattini, O. P. (1965). *Entomologia médica: culicini: culex, Aedes e Psorophora* (Vol. 2). Faculdade de Higiene e Saúde Pública, Depto. de Parasitología.

Garcia-Rejon, J. E., Ulloa-Garcia, A., Cigarroa-Toledo, N., Pech-May, A., Machain-Williams, C., Cetina-Trejo, R. C., ... & Baak-Baak, C. M. (2018). Study of *Aedes aegypti* population with emphasis on the gonotrophic cycle length and identification of arboviruses: implications for vector management in cemeteries. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, *60*.

Gómez-Palacio, A., Suaza-Vasco, J., Castaño, S., Triana, O., & Uribe, S. (2017). *Aedes albopictus* (Skuse, 1894) infected with the American-Asian genotype of dengue type 2 virus in Medellín suggests its possible role as vector of dengue fever in Colombia. *Biomédica*, *37*, 135-142.

Gu, W., Lampman, R., & Novak, R. J. (2004). Assessment of arbovirus vector infection rates using variable size pooling. *Medical and veterinary entomology*, *18*(2), 200-204

Gutiérrez-Bugallo, G., Rodríguez-Roche, R., Díaz, G., Pérez, M., Mendizábal, M. E., Peraza, I., ... & Guzmán, M. G. (2018). Spatio-temporal distribution of vertically transmitted dengue viruses by *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) from Arroyo Naranjo, Havana, Cuba. *Tropical Medicine & International Health*, *23*(12), 1342-1349.

Gómez-Palacio, A., Suaza-Vasco, J., Castaño, S., Triana, O., & Uribe, S. (2017). *Aedes albopictus* (Skuse, 1894) infected with the American-Asian genotype of dengue type 2 virus in Medellín suggests its possible role as vector of dengue fever in Colombia. *Biomédica*, *37*, 135-142.

Hall, R. J., Wang, J., Todd, A. K., Bissielo, A. B., Yen, S., Strydom, H., ... & Peacey, M. (2014). Evaluation of rapid and simple techniques for the enrichment of viruses prior to metagenomic virus discovery. *Journal of virological methods*, *195*, 194-204.

Higa, Y., Yen, N. T., Kawada, H., Son, T. H., Hoa, N. T., & Takagi, M. (2010). Geographic distribution of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* collected from used tires in Vietnam. *Journal of the American Mosquito Control Association*, *26*(1), 1-9.

Hoyos-López, R., Atencia-Pineda, M. C., & Gallego-Gómez, J. C. (2019). Phylogenetic analysis of Dengue-2 serotypes circulating in mangroves in Northern Cordoba,

Hoyos-López, R., Suaza-Vasco, J., Rúa-Uribe, G., Uribe, S., & Gallego-Gómez, J. C. (2016). Molecular detection of flaviviruses and alphaviruses in mosquitoes (Diptera: Culicidae) from coastal ecosystems in the Colombian Caribbean. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, *111*(10), 625-634.

Jaimes-Duenez, J., Arboleda, S., Triana-Chávez, O., & Gomez-Palacio, A. (2015). Spatio-temporal distribution of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) mitochondrial lineages in cities with distinct dengue incidence rates suggests complex population dynamics of the dengue vector in Colombia. *PLoS Negl Trop Dis*, *9*(4), e0003553.

Joyce, A. L., Torres, M. M., Torres, R., & Moreno, M. (2018). Genetic variability of the *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) mosquito in El Salvador, vector of dengue, yellow fever, chikungunya and Zika. *Parasites & vectors*, *11*(1), 637.

Kraemer, M. U., Sinka, M. E., Duda, K. A., Mylne, A. Q., Shearer, F. M., Barker, C. M., ... & Hendrickx, G. (2015). The global distribution of the arbovirus vectors *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus*. *elife*, 4, e08347.

Kraemer, M. U., Reiner, R. C., Brady, O. J., Messina, J. P., Gilbert, M., Pigott, D. M., ... & Shirude, S. (2019). Past and future spread of the arbovirus vectors *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. *Nature microbiology*, 4(5), 854.

Lanciotti, R. S., Kosoy, O. L., Laven, J. J., Panella, A. J., Velez, J. O., Lambert, A. J., & Campbell, G. L. (2007). Chikungunya virus in US travelers returning from India, 2006. *Emerg Infect Dis*, 13(5), 764-767. doi:10.3201/eid1305.070015

Lee, Y., Schmidt, H., Collier, T. C., Conner, W. R., Hanemaaijer, M. J., Slatkin, M., ... & Mulligan, F. S. (2019). Genome-wide divergence among invasive populations of *Aedes aegypti* in California. *BMC genomics*, 20(1), 1-10.

Li, Y., Kamara, F., Zhou, G., Puthiyakunnon, S., Li, C., Liu, Y., ... & Chen, X. G. (2014). Urbanization increases *Aedes albopictus* larval habitats and accelerates mosquito development and survivorship. *PLoS Negl Trop Dis*, 8(11), e3301.

Liang, L., Jia, P., Tan, X., Chen, J., & Chen, X. (2019). Potential effects of heat waves on the population dynamics of the dengue mosquito *Aedes albopictus*. *PLoS neglected tropical diseases*, 13(7), e0007528.

Long, K. C., Ziegler, S. A., Thangamani, S., Hausser, N. L., Kochel, T. J., Higgs, S., & Tesh, R. B. (2011). Experimental transmission of Mayaro virus by *Aedes aegypti*. *Am J Trop Med Hyg*, 85(4), 750-757. doi:10.4269/ajtmh.2011.11-0359

Lorenz, C., Ribeiro, A. F., & Chiaravalloti-Neto, F. (2019). Mayaro virus distribution in South America. *Acta tropica*, 198, 105093.

Lounibos, L. P., & Kramer, L. D. (2016). Invasiveness of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* and vectorial capacity for chikungunya virus. *The Journal of infectious diseases*, 214(suppl_5), S453-S458.

Lourenço-de-Oliveira, R., Vazeille, M., Filippis, A. M. B. D., & Failloux, A. B. (2002). Oral susceptibility to yellow fever virus of *Aedes aegypti* from Brazil. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 97(3), 437-439.

Lozano-Fuentes, S., Hayden, M. H., Welsh-Rodriguez, C., Ochoa-Martinez, C., Tapia-Santos, B., Kobylinski, K. C., . . . Eisen, L. (2012). The dengue virus mosquito vector *Aedes aegypti* at high elevation in Mexico. *Am J Trop Med Hyg*, 87(5), 902-909. doi:10.4269/ajtmh.2012.12-0244

Maia, L. M. S., Bezerra, M. C. F., Costa, M. C. S., Souza, E. M., Oliveira, M. E. B., Ribeiro, A. L. M., ... & Silhessarenko, R. D. (2019). Natural vertical infection by dengue virus serotype 4, Zika virus and Mayaro virus in *Aedes (Stegomyia) aegypti* and *Aedes (Stegomyia) albopictus*. *Medical and veterinary entomology*, 33(3), 437-442.

Massaro, E., Kondor, D., & Ratti, C. (2019). Assessing the interplay between human mobility and mosquito borne diseases in urban environments. *Scientific reports*, 9(1), 1-13

Martínez-Vega, R. A., Danis-Lozano, R., Díaz-Quijano, F. A., Velasco-Hernández, J., Santos-Luna, R., Román-Pérez, S., ... & Ramos-Castañeda, J. (2015). Peridomestic infection as a determining factor of dengue transmission. *PLoS neglected tropical diseases*, 9(12), e0004296.

Patsoula, E., Samanidou-Voyadjoglou, A., Spanakos, G., Kremastinou, J., Nasioulas, G., & Vakalis, N. C. (2006). Molecular and morphological characterization of *Aedes albopictus* in northwestern Greece and differentiation from *Aedes cretinus* and *Aedes aegypti*. *Journal of medical entomology*, 43(1), 40-54.

Pech-May, A., Moo-Llanes, D. A., Puerto-Avila, M. B., Casas, M., Danis-Lozano, R., Ponce, G., ... & González, C. (2016). Population genetics and ecological niche of invasive *Aedes albopictus* in Mexico. *Acta Tropica*, 157, 30-41.

Pereira, T. N., Carvalho, F. D., De Mendonça, S. F., Rocha, M. N., & Moreira, L. A. (2020). Vector competence of *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus*, and *Culex quinquefasciatus* mosquitoes for Mayaro virus. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 14(4), e0007518.

Ortiz-Canamejoy, K., & Villota, A. C. (2018). Primera evidencia de *Aedes albopictus* en el departamento del Putumayo, Colombia. *MedUNAB*, 21(1), 10-15.

Rahayu, A., Saraswati, U., Supriyati, E., Kumalawati, D. A., Hermantara, R., Rovik, A., ... & Wardana, D. S. (2019). Prevalence and Distribution of Dengue Virus in *Aedes aegypti* in Yogyakarta City before Deployment of Wolbachia Infected *Aedes aegypti*. *International journal of environmental research and public health*, 16(10), 1742.

Ramasamy, R., Surendran, S. N., Jude, P. J., Dharshini, S., & Vinobaba, M. (2011). Larval development of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in peri-urban brackish water and its implications for transmission of arboviral diseases. *PLoS neglected tropical diseases*, 5(11), e1369.

Roehrig, J. T., & Lanciotti, R. S. (2009). Arboviruses. In *Clinical Virology Manual, Fourth Edition* (pp. 387-407). American Society of Microbiology.

Salehi Z, Najafi M (2014) RNA preservation and stabilizatón. *Biochem Physiol: Open Access* 3: 1-4.

Santiago, G. A., Vergne, E., Quiles, Y., Cosme, J., Vazquez, J., Medina, J. F., . . . Munoz-Jordan, J. L. (2013). Analytical and clinical performance of the CDC real time RT-PCR

assay for detection and typing of dengue virus. *PLoS Negl Trop Dis*, 7(7), e2311.

doi:10.1371/journal.pntd.0002311

Sarfraz, M. S., Tripathi, N. K., Tipdecho, T., Thongbu, T., Kerdthong, P., & Souris, M. (2012). Analyzing the spatio-temporal relationship between dengue vector larval density and land-use using factor analysis and spatial ring mapping. *BMC public health*, 12(1), 853.

Shope, R. E., & Meegan, J. M. (1997). Arboviruses. In *Viral Infections of Humans* (pp. 151-183). Springer, Boston, MA.p.151.

Turell, M. J., Beaman, J. R., & Tammariello, R. F. (1992). Susceptibility of selected strains of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) to chikungunya virus. *Journal of medical entomology*, 29(1), 49-53.

Velandia-Romero, M. L., Olano, V. A., Coronel-Ruiz, C., Cabezas, L., Calderón-Peláez, M. A., Castellanos, J. E., & Matiz, M. I. (2017). Detección del virus del dengue en larvas y pupas de *Aedes aegypti* recolectadas en áreas rurales del municipio de Anapoima, Cundinamarca, Colombia. *Biomédica*, 37, 193-200.

Vega-Rúa, A., Zouache, K., Girod, R., Failloux, A. B., & Lourenço-de-Oliveira, R. (2014). 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*, 88(11), 6294-6306.

Villar, L. A., Rojas, D. P., Besada-Lombana, S., & Sarti, E. (2015). Epidemiological trends of dengue disease in Colombia (2000-2011): a systematic review. *PLoS neglected tropical diseases*, 9(3).

Walter, SD, Hildreth, SW y Beaty, BJ (1980). Estimación de las tasas de infección en poblaciones de organismos utilizando grupos de tamaño variable. *American Journal of Epidemiology*, 112 (1), 124-128.

Weaver, S. C., & Barrett, A. D. (2004). Transmission cycles, host range, evolution and emergence of arboviral disease. *Nature Reviews Microbiology*, 2(10), 789

Whiteman, A., Gomez, C., Rovira, J., Chen, G., McMillan, W. O., & Loaiza, J. (2019). Aedes Mosquito Infestation in Socioeconomically Contrasting Neighborhoods of Panama City. *EcoHealth*, 16(2), 210-221.

World Health Organization. (2020). Real-time RT-PCR (TaqManTM) protocol – Mayaro virus (MAYV). Obtenido de: <https://www.paho.org/en/node/60626>

Zamora-Delgado, J., Castaño, J. C., & Hoyos-López, R. (2015). DNA barcode sequences used to identify Aedes (Stegomyia) albopictus (Diptera: Culicidae) in La Tebaida (Quindío, Colombia). *Revista Colombiana de Entomología*, 41(2), 212-217

Zhu, G., Liu, T., Xiao, J., Zhang, B., Song, T., Zhang, Y., ... & Hao, Y. (2019). Effects of human mobility, temperature and mosquito control on the spatiotemporal transmission of dengue. *Science of the Total Environment*, 651, 969-978.