

Transmisión vertical de los virus del dengue en poblaciones cubanas de *Aedes aegypti*

Gutiérrez Bugallo, Gladys¹
Rodríguez Roche, Rosmari
Díaz Gutiérrez, Gisell²
Mendizábal Alcalá, María Elena³
Peraza Cuesta, Iris³
Pérez Castillo, Magaly³
Vázquez Perera, Antonio A.¹
Rodríguez Coto, Magdalena¹
Álvarez Vera, Mayling²
Bisset Lazcano, Juan A.¹
Guzmán Tirado, María Guadalupe²

¹ Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí"/Departamento Control de Vectores, La Habana, Cuba, gladysg@ipk.sld.cu

² Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí"/Departamento de Virología, La Habana, Cuba

³ Unidad Provincial de Vigilancia y Lucha Antivectorial, La Habana, Cuba

Resumen:

El dengue es una enfermedad viral aguda, de importancia mundial, producida por un complejo de igual nombre compuesto por cuatro serotipos (DENV-1, DENV-2, DENV-3 y DENV-4) que son transmitidos al hombre por *Aedes aegypti*. Se ha comprobado que, en condiciones naturales, las hembras infectadas de *Ae. aegypti* pueden transmitir los virus a su descendencia, lo que podría suponer un mayor riesgo epidemiológico; sin embargo este fenómeno no se ha estudiado en Cuba. Por ello, el objetivo del presente trabajo fue determinar la ocurrencia de transmisión vertical de los virus del dengue en poblaciones naturales de *Ae. aegypti* y su comportamiento espacio-temporal en el municipio capitalino Arroyo Naranjo. Se realizaron colecciones mensuales de larvas y pupas de *Ae. aegypti* durante septiembre 2013 a julio 2014 en las áreas de salud del municipio, que se analizaron por técnicas moleculares, para determinar la presencia de los virus del dengue. Así, de 111 grupos de larvas y pupas procesadas (4102 ejemplares), 37 resultaron positivos al menos a un serotipo de dengue, de manera que se demuestra, por primera vez, la ocurrencia de transmisión vertical de estos virus en poblaciones cubanas de *Ae. aegypti*. Excepto en enero, en todos los meses se detectaron estadios inmaduros infectados, lo cual sugiere una circulación sostenida de los virus en las poblaciones del vector. Los cuatro serotipos se encontraron en el territorio estudiado, lo que avala la utilidad del monitoreo de la transmisión vertical en la vigilancia virológica. La ocurrencia de la transmisión vertical de los virus del dengue en poblaciones cubanas de *Ae. aegypti* supone un incremento en las acciones de control de los estadios inmaduros de este vector y propone la vigilancia de los DENVs en la población pre-adulta de *Ae. aegypti* como una herramienta para la vigilancia virológica en Cuba.

Palabras claves: *Aedes aegypti*, transmisión vertical, dengue, vigilancia virológica, control vectorial

I. INTRODUCCIÓN

El dengue es la enfermedad viral transmitida por artrópodos de mayor importancia en humanos, con un aproximado de 390 millones de infecciones anuales. Se estima que el 75% de estas infecciones, son clínicamente inaparentes o levemente sintomáticas (1). El agente etiológico de esta enfermedad es un complejo viral compuesto por cuatro serotipos antigénicamente diferentes (DENV-1, DENV-2, DENV-3 y DENV-4), pertenecientes al género *Flavivirus* (Familia: *Flaviviridae*). Estos virus son transmitidos al hombre en el mundo principalmente por *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Diptera: Culicidae) (2).

En Cuba han ocurrido varias epidemias y brotes de distintos serotipos de dengue, con fatales consecuencias para la población humana (3). A pesar de los esfuerzos para controlar la transmisión de este arbovirus, recientemente se ha informado la co-circulación de varios DENVs (4).

La transmisión horizontal de dengue entre humanos y mosquitos es determinante en la epidemiología de esta enfermedad (5). Sin embargo, se ha demostrado que *Ae. aegypti* es capaz de transmitir los virus del dengue a su descendencia después de haberse infectado (transmisión vertical) (6, 7). La transmisión vertical se ha sugerido como un importante mecanismo de mantenimiento de los virus en las poblaciones del vector durante períodos adversos para su transmisión horizontal, lo que podría tener implicaciones importantes en la epidemiología de la enfermedad (8).

Por otra parte, varios autores han verificado la factibilidad de la detección y serotipificación de los DENVs en mosquitos del género *Aedes* en la vigilancia molecular de estos virus, y la han propuesto como un sistema de alerta temprana para brotes de dengue (9, 10).

El control de la transmisión de dengue está basado en estrategias integradas de disminución de las poblaciones del vector. De esta manera, cada vez se hacen más necesarias las investigaciones en el contexto nacional encaminadas a profundizar en el conocimiento de las vías de transmisión del dengue y mejorar los sistemas de vigilancia que faciliten el monitoreo de la situación epidemiológica. Ante este panorama, el objetivo del presente trabajo fue: determinar la ocurrencia de la transmisión vertical de los virus del dengue en poblaciones naturales de *Aedes aegypti* y su comportamiento espacio-temporal en el municipio Arroyo Naranjo durante 2013-2014.

II. MÉTODO

A. Descripción del área de estudio

El estudio fue realizado en el municipio Arroyo Naranjo, ubicado al centro sur de la provincia La Habana. La población es atendida en siete áreas de salud (Tabla1).

B. Obtención y procesamiento de muestras entomológicas

Las larvas y pupas se colectaron mensualmente por los operarios del Programa de Control de *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus* del Ministerio de Salud Pública en todas las áreas de salud del municipio Arroyo Naranjo, como parte de sus actividades de rutina. Los especímenes que se clasificaron como *Ae. aegypti* (12), se conservaron en etanol 70% y se almacenaron a 4°C antes de ser procesados. Los datos que acompañaban cada muestra (fecha de colecta, lugar, manzana y área de salud) se almacenaron en la base de datos del laboratorio.

Con las muestras entomológicas recibidas se formaron grupos mixtos (larvas y pupas), de entre 30-55 individuos, colectados en el mismo mes y área de salud según muestra la tabla 1. Se formaron grupos con menos de 30 especímenes cuando en un mes y área de salud la cantidad de mosquitos no alcanzó una cifra mayor que 30.

Tabla 1. Cantidad de ejemplares recibidos (N) y grupos formados (G) por área de salud y meses de estudio.

Área salud		2013				2014							Total
		Sept	Oct	Nov	Dic	Ene	Feb	Mar	Abr	May	Jun	Jul	
Mantilla	N	270	135	118	134	68	48	33	37	210	104	37	1194
	G	9	3	3	3	2	1	1	1	7	3	1	34
Párraga	N	0	107	88	73	24	84	76	115	121	63	25	776
	G	0	2	2	2	1	2	2	3	3	2	1	20
Grimau	N	0	187	132	89	89	68	31	99	44	19	0	758
	G	0	4	3	2	2	2	1	3	1	1	0	19
Los Pinos	N	0	131	185	81	23	97	66	72	0	32	0	687
	G	0	3	4	2	1	2	2	2	0	1	0	17
Capri	N	0	144	83	32	21	22	0	30	31	0	53	416
	G	0	3	2	1	1	1	0	1	1	0	1	11
Eléctrico	N	0	0	86	11	0	0	0	0	25	19	39	180
	G	0	0	2	1	0	0	0	0	1	1	1	6
Managua	N	0	27	27	0	0	0	18	0	0	19	0	91
	G	0	1	1	0	0	0	1	0	0	1	0	4
Total	N	270	731	719	420	225	319	224	353	431	256	154	4102
	G	9	16	17	11	7	8	7	10	13	9	4	111

Los 111 grupos de larvas y pupas se lavaron y maceraron con morteros estériles en 200 µL de medio esencial mínimo (Gibco, Alemania) suplementado con suero fetal bovino 2% y Pen Strep 0,2% (100 U/mL penicilina y 100 µg/mL estreptomycin) (Gibco, Alemania). El homogenado se centrifugó a 13000xg, por 15 min, a 4°C y el sobrenadante se conservó a -80°C.

C. Extracción del ARN viral, detección y serotipificación de los virus del dengue

La extracción del ARN de los DENVs de cada grupo se efectuó en un extractor automático Qiacube (Qiagen, Alemania). Para ello se utilizó el estuche comercial *QIAamp viral RNA* (Qiagen, Alemania) y 140 µL del sobrenadante del homogenado de cada grupo y se procedió según las indicaciones del fabricante.

La detección y serotipificación de los virus del dengue se realizó a través de una Reacción en cadena de la polimerasa (PCR, de sus siglas en inglés) anidada, según el protocolo descrito por Lanciotti *et al.* (13). Como control negativo del ensayo se utilizó agua libre de nucleasas y como control positivo se utilizó la cepa de DENV-3 116/2000 que contaba con cinco pasajes en la línea celular C6/36 HT.

Para evidenciar la presencia del producto obtenido en la PCR anidada, se realizó una electroforesis en gel de agarosa a 2 %. La identificación de los serotipos virales se realizó comparando las tallas de los productos obtenidos con un patrón preparado a partir productos de amplificación de los cuatro serotipos de dengue utilizando cepas virales.

III.RESULTADOS

a. Detección y serotipificación de los virus del dengue

De los 111 grupos examinados, 37 resultaron positivos al menos a un DENV (33,3%) y durante el período de estudio se detectaron los cuatro serotipos. Esto confirma la ocurrencia de transmisión vertical de los DENVs en poblaciones cubanas de *Ae. aegypti*.

Estos resultados constituyen el primer estudio que demuestra la ocurrencia de transmisión vertical de los virus del dengue en poblaciones cubanas de *Ae. aegypti*. Aunque la relevancia epidemiológica de la transmisión vertical todavía está en discusión (5), es un hecho que vectores potencialmente infectantes permanecen en la naturaleza por períodos de tiempo relativamente largos en forma de huevos. Una vez que estos huevos eclosionan, a la par del desarrollo larvario ocurre la replicación viral, de modo que cuando una hembra infectada emerge, pudiera ser infecciosa y capaz de transmitir el virus (14) sin tener que ponerse previamente en contacto con un humano infectado. De esta manera, el riesgo epidemiológico de transmisión de dengue en el contexto cubano actual podría estar incrementado. Estos elementos aumentan la importancia de la vigilancia entomológica molecular de los DENVs en el monitoreo de la circulación viral (15), como un posible sistema de alerta temprana de brotes de dengue (9, 10), así como para el apropiado y oportuno control de las poblaciones del vector de este arbovirus en el contexto cubano.

b. Distribución espacio-temporal de los virus del dengue

Se encontraron diferentes patrones de distribución de los DENVs en las áreas de salud del municipio Arroyo Naranjo durante todo el periodo de estudio (figura 1). En todas las áreas de salud se detectaron estadios inmaduros de *Ae. aegypti* infectados con los DENVs. El serotipo que se encontró en mayor proporción en todo el período de estudio fue DENV-1 (35,4%) y en orden decreciente: DENV-3 (33,3%), DENV-2 (25%) y DENV-4 (6,3%).

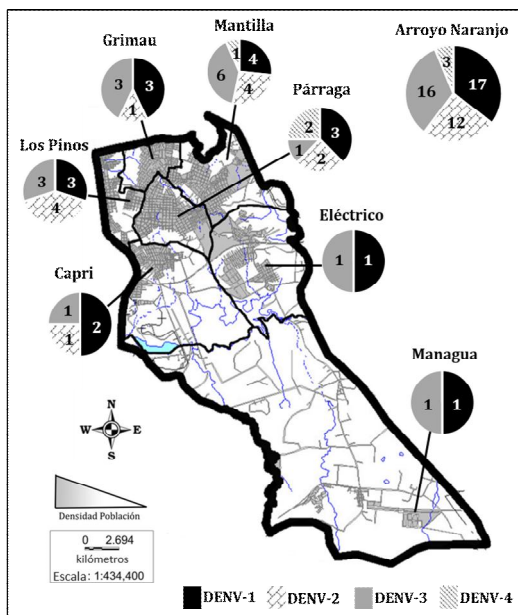


Figura 1. Proporción de los serotipos de dengue encontrados en estadios inmaduros de *Aedes aegypti* colectados en cada área de salud y el municipio Arroyo Naranjo entre septiembre 2013 y julio 2014. Los valores que aparecen al interior de los gráficos circulares se corresponden con el número de grupos de estadios inmaduros de *Ae. aegypti* positivos a cada serotipo viral.

La distribución espacio-temporal de los DENVs en Arroyo Naranjo se manifestó de forma estratificada. Las áreas en las que se detectaron los cuatro DENVs (Mantilla y Párraga) son las más pobladas del municipio. De hecho, en una investigación realizada en el municipio La Lisa de La Habana se comprobó que en los consejos populares con mayor densidad poblacional se observaba mayor positividad de los recipientes a *Ae. aegypti* (16). Estas características favorecen la existencia de poblaciones de este culicido que exhibe en estas áreas altos valores de Índice Casa ($IC_{Mantilla}=1,37$; $IC_{Párraga}=1,09$) (11). De esta manera se potencia el contacto vector-hombre y con ello el riesgo de transmisión de este flavivirus (2).

Además, en las áreas de salud más cercanas al centro de la provincia La Habana (Grimau, Los Pinos, Párraga, Mantilla) existe mayor flujo y confluencia de personas. Dado el rango de vuelo de *Ae. aegypti*, se ha propuesto que la movilidad humana, más que la dispersión del vector, es el determinante principal de la amplificación y distribución de los DENVs (17). Así, los DENVs tienen incrementado su potencialidad de dispersión en estas áreas, debido al flujo poblacional constante (17).

En la figura 2 se muestran las variaciones temporales de las proporciones de los DENVs en los grupos de *Ae. aegypti* de Arroyo Naranjo. Excepto en enero, en todos los meses se detectó al menos un serotipo de dengue en larvas y pupas del municipio. El serotipo viral de mayor frecuencia de aparición durante el período de estudio en el municipio fue DENV-3 (0,73), seguido por DENV-1 (0,64), DENV-2 (0,27) y DENV-4 (0,18). La detección de grupos de estadios inmaduros infectados en casi la totalidad de los meses de estudio, sugiere una circulación sostenida de los DENVs en las poblaciones pre-adulta del vector en Arroyo Naranjo en este período.

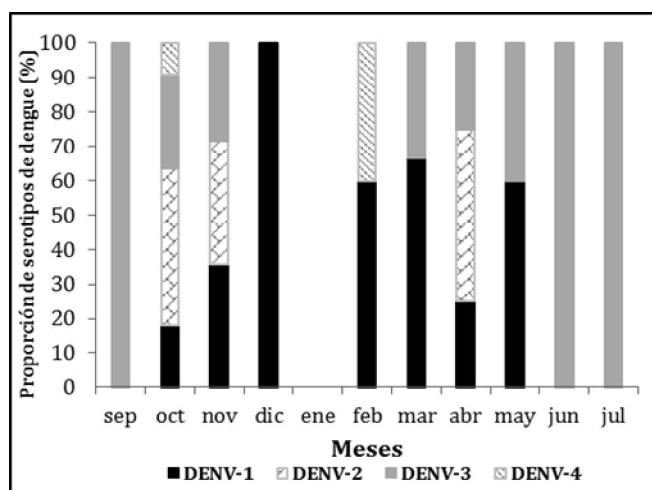


Figura 2. Variación temporal de la proporción de los virus del dengue detectados en los grupos de estadios inmaduros de *Aedes aegypti* en Arroyo Naranjo durante septiembre 2013-julio 2014.

Los serotipos encontrados en las muestras entomológicas deberían guardar relación con los identificados en la vigilancia virológica de muestras clínicas. La comparación entre los DENVs detectados en humanos (18) y en las poblaciones inmaduras de *Ae. aegypti* de Arroyo Naranjo se muestra en la Tabla 2.

Tabla 2. Proporción de los DENVs en muestras entomológicas de Arroyo Naranjo y clínicas (cualitativamente) durante 2013 y 2014.

Serotipo	Tipo de muestra	2013	2014
DENV-1	Entomológicas	27,6	47,4
	Clínicas	0	0
DENV-2	Entomológicas	34,5	10,5
	Clínicas	(+)	(+++)
DENV-3	Entomológicas	34,5	31,6
	Clínicas	(++)	(++)
DENV-4	Entomológicas	3,4	10,5
	Clínicas	(+++)	(+)

Resulta contrastante el hecho de que DENV-1, de mayor prevalencia en el período de estudio en larvas y pupas de Arroyo Naranjo, no apareció en ninguna de las muestras clínicas procesadas por el Laboratorio Nacional de Referencia de Arbovirus del IPK en 2013-2014. Esto pudiera guardar relación con la preponderancia de los casos asintomáticos sobre los sintomáticos que de manera global se presenta en el dengue (1). Por otro lado, se ha demostrado que las personas con infecciones naturales por DENV y sin síntomas clínicos pueden contribuir a la dinámica de transmisión a través de la eficiente infección de mosquitos *Ae. aegypti* (19). También se debe tener en cuenta que las personas asintomáticas están expuestas a la picada de vectores de varios lugares que visiten ya que, por lo general, no interrumpen su rutina diaria, lo que los convierte además en una fuente importante en la dispersión de estos virus (17, 19). Tampoco se debe descartar que las personas infectadas por dengue y que manifiestan síntomas leves, comúnmente no asisten a los centros asistenciales y portan la infección sin aislamiento que evite la transmisión. Esta realidad, además de potenciar la dispersión arboviral, impide que los sistemas de vigilancia puedan detectarlos y tipificarlos. Los sistemas de vigilancia de los DENVs son de suma importancia, ya que monitorean la circulación de los serotipos de este arbovirus. Varios autores han propuesto la detección y serotipificación de los DENVs en mosquitos del género *Aedes* como un método útil y factible de vigilancia molecular de dengue (9, 15). Estos elementos, sumados a los resultados de esta investigación, sugieren que la vigilancia de los DENVs en estadios inmaduros de *Ae. aegypti* en el actual contexto epidemiológico, puede complementar el monitoreo de la circulación viral que se lleva a cabo a través de la vigilancia virológica de muestras clínicas.

IV.CONCLUSIONES

1. La detección de los virus del dengue en estadios inmaduros de *Ae. aegypti* del municipio Arroyo Naranjo demostró, por primera vez, la ocurrencia de su transmisión vertical en Cuba, lo que refuerza la importancia del control de las poblaciones pre-adultas del vector en la prevención de posibles brotes de dengue.
2. La frecuencia de aparición de los virus del dengue y la presencia de los cuatro serotipos en estadios inmaduros de *Ae. aegypti* de Arroyo Naranjo, sugieren una circulación sostenida de los virus en las

poblaciones del vector en este municipio y avala la utilidad del monitoreo de la transmisión vertical de los virus del dengue en *Ae. aegypti* como una herramienta para la vigilancia virológica.

REFERENCIAS

1. Bhatt S, Gething PW, Brady OJ, Messina JP, Farlow AW, Moyes CL, et al. The global distribution and burden of dengue. *Nature*. 2013;496(7446):504-7.
2. Ritchie SA. Dengue vector bionomics: why *Aedes aegypti* is such a good vector. . In: Gubler DJ, Ooi EE, Vasudevan S, Farrar J, editors. *Dengue and dengue hemorrhagic fever*. 2nd Edition ed: CAB International; 2014. p. 455-80.
3. Guzman MG, Kouri G, Martinez E, Bravo J, Riveron R, Soler M, et al. Clinical and serologic study of Cuban children with dengue hemorrhagic fever/dengue shock syndrome (DHF/DSS). *Bulletin of the Pan American Health Organization*. 1987;21(3):270-9.
4. Díaz G. [Molecular epidemiology of dengue viruses in Cuba, 2009-2014] [BSc Thesis]. Havana: University of Havana; 2014.
5. Lequime S, Lambrechts L. Vertical transmission of arboviruses in mosquitoes: a historical perspective. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*. 2014;28:681-90.
6. Joshi V, Mourya DT, Sharma RC. Persistence of dengue-3 virus through transovarial transmission passage in successive generations of *Aedes aegypti* mosquitoes. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 2002;67(2):158-61.
7. Wasinpiyamongkol L, Thongrunkiat S, Jirakanjanakit N, Apiwatnasorn C. Susceptibility and transovarial transmission of dengue virus in *Aedes aegypti*: a preliminary study of morphological variations. *The Southeast Asian journal of tropical medicine and public health*. 2003;34 Suppl 2:131-5.
8. Lequime S, Paul RE, Lambrechts L. Determinants of Arbovirus Vertical Transmission in Mosquitoes. *PLoS pathogens*. 2016;12(5):e1005548.
9. Chow VT, Chan YC, Yong R, Lee KM, Lim LK, Chung YK, et al. Monitoring of dengue viruses in field-caught *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* mosquitoes by a type-specific polymerase chain reaction and cycle sequencing. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 1998;58(5):578-86.
10. Dzúl-Manzanilla F, Martínez NE, Cruz-Nolasco M, Gutiérrez-Castro C, López-Damian L, Ibarra-López J, et al. Evidence of vertical transmission and co-circulation of chikungunya and dengue viruses in field populations of *Aedes aegypti* (L.) from Guerrero, Mexico. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 2016;110(2):141-4.
11. Dirección Municipal de Salud Pública, Arroyo Naranjo. Base de datos: Índice Casa para *Aedes aegypti*. La Habana, Cuba. 2010-2015.
12. González R. *Culícidos de Cuba*. La Habana: Editorial Científico-Técnica; 2006. 184 p.
13. Lanciotti RS, Calisher CH, Gubler DJ, Chang GJ, Vorndam AV. Rapid detection and typing of dengue viruses from clinical samples by using reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Journal of clinical microbiology*. 1992;30(3):545-51.
14. Thangamani S, Huang J, Hart CE, Guzman H, RB. T. Vertical Transmission of Zika Virus in *Aedes aegypti* Mosquitoes. *Am J Trop Med Hyg*. 2016;95(5):1169-73.
15. Guedes DR, Cordeiro MT, Melo-Santos MA, Magalhaes T, Marques E, Regis L, et al. Patient-based dengue virus surveillance in *Aedes aegypti* from Recife, Brazil. *Journal of vector borne diseases*. 2010;47(2):67-75.
16. Bisset JA, Marquetti MC, García A, Vandelerberghe V, Leyva M, Van der Stuyft P, et al. [Pupal surveillance of *Aedes aegypti* as a tool for control of the vector in a municipality with low density of La Habana City, Cuba]. *Rev Biomed*. 2008;19:92-103.
17. Stoddard ST, Forshey BM, Morrison AC, Paz-Soldan VA, Vazquez-Prokopec GM, Astete H, et al. House-to-house human movement drives dengue virus transmission. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2013;110(3):994-9.
18. Laboratorio Nacional de Referencia de Arbovirus I. Base de datos: Diagnóstico virológico molecular de dengue. La Habana, Cuba 2013-2015.
19. Duong V, Lambrechts L, Paul RE, Ly S, Lay RS, Long KC, et al. Asymptomatic humans transmit dengue virus to mosquitoes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2015;112(47):14688-93.