UNIVERSIDAD DE COSTA RICA
SISTEMA DE ESTUDIOS DE POSGRADO

DIVERSIDAD, PREFERENCIAS ALIMENTARIAS Y PREVALENCIA VIRAL EN MOSQUITOS (DIPTERA: CULICIDAE) EN DOS ZONAS ENDÉMICAS A ARBOVIRUS ZOONÓTICOS DE COSTA RICA.

Tesis sometida a la consideración de la Comisión del Programa de Posgrado en Microbiología, Parasitología, Química Clínica e Inmunología para optar al grado y título de Maestría Académica en Microbiología.

LUIS MARIO ROMERO VEGA

Ciudad Universitaria Rodrigo Facio, Costa Rica

2020

Dedicatoria

A Papi, Mami, Ana, Lau y Lumi.

Muchas gracias.

"Esta tesis fue aceptada por la Comisión del Programa de Estudios de Posgrado en Microbiología, Parasitología, Química Clínica e Inmunología de la Universidad de Costa Rica como requisito parcial para optar al grado y título de **Maestría Académica en Microbiología**."

PhD. Carlos Chacón Díaz
Representante del Decano
Sistema de Estudios de Posgrado

PhD. Adriana Troyo Rodríguez
Directora de Tesis

PhD. Eugenia Corrales Aguilar
Asesora

PhD. Luis Fernando Chaves Sanabria
Asesor

PhD. Fernando Soley Guardia
Representante del Director de Programa de Posgrado

Luis Mario Romero Vega
Candidato

Tabla de Contenidos

Dedicatoria ..... **II**
Hoja de Firmas ..... **III**
Tabla de Contenidos ..... **IV**
Índice de Cuadros ..... **VI**
Índice de Figuras ..... **VII**
Lista de Abreviaturas ..... **VIII**
Resumen ..... **IX**
Abstract ..... **X**
Introducción **1**
2. Justificación **6**
3. Hipótesis **8**
4.1. Objetivo general **9**
4.2. Objetivos específicos **9**
5. Metodología **10**
5.1. Sitios de muestreo 10
5.2. Captura de mosquitos 14
5.2.1. Adultos 14
5.2.2. Larvas 14
5.3. Montaje e identificación morfológica 15
5.3.1. Adultos 15
5.4. Extracción de ácidos nucleicos y transcripción reversa 15
5.5. Detección viral 16
5.6. Identificación de fuente de alimentación sanguínea 18
5.7. Análisis de datos 18
5.7.1. Curvas de rarefacción, riqueza de especies y diversidad de especies 19
5.7.2. Preferencias alimentarias 20
5.7.3. Positividad viral 20
5.7.4. Tasa de infección mínima 21
6. Resultados **22**
6.1. Captura e identificación de mosquitos 22
6.2. Curvas de rarefacción de Coleman 30
6.3. Estimación de riqueza y diversidad de especies 32
6.4. Análisis de preferencias alimentarias 33

6.5. Positividad viral 35
7. Discusión 36
7.1. Especies vectoras y métodos de captura 36
7.2. Estructura de las comunidades de mosquitos 39
7.2.1. Estimación de riqueza 41
7.2.2. Diversidad de especies 41
7.3. Preferencias alimentarias 42
7.4. Prevalencias virales 43
8. Conclusiones 46
9. Resumen esquemático 47
10. Recomendaciones 48
11. Condiciones de Biodiversidad y Financiamiento 49
12. Referencias 50
13. Anexos 63
Coordenadas de puntos de muestreo 63
Trámite de Ingreso Área de Conservación Tempisque 64
Trámite de Ingreso Área de Conservación La Amistad-Caribe 65
Resolución de la Comisión Institucional de Biodiversidad 74
Otras publicaciones asociadas a mosquitos en Costa Rica y enfermedades vectoriales. 78

Índice de Cuadros

Cuadro 1. Mosquitos capturados en trampas EVS en Cuajiniquil…….……23
Cuadro 2. Mosquitos capturados en trampas EVS en Talamanca…….24
Cuadro 3. Especies capturadas en Cuajiniquil utilizando las trampas para hembras grávidas……..…25
Cuadro 4. Especies capturadas utilizando las trampas para *Aedes* grávidas BG-GAT…..26
Cuadro 5. Especies capturadas en Ovitrampas en Cuajiniquil y Talamanca…….....27
Cuadro 6. Especies de larvas colectadas en sitios de cría naturales en los cantones de Cuajiniquil y Talamanca……...……29
Cuadro 7. Positividad viral en *pooles* de mosquitos……35
Cuadro 8. Tasa de Infección Mínima para cada especie de mosquito…….35

Índice de Figuras

Figura 1. Sitios de muestreo en el cantón de Cuajiniquil…….……....13
Figura 2. Sitios de muestreo en el cantón de Talamanca…….....14
Figura 3. Curvas de rarefacción de Coleman ……31
Figura 4. Estimación de la riqueza de especies…….....32
Figura 5. Índices de Shannon……33
Figura 6. Preferencias alimentarias identificadas en mosquitos de Cuajiniquil y Talamanca…… 34
Figura 7. Resumen Esquemático……. 47

Lista de Abreviaturas

BG-GAT	Trampas para *Aedes* grávidas
BO	Bosque
DO	Domiciliar
CEC	Comité Ético Científico de la Universidad de Costa Rica
cDNA	ADN complementario
CHIKV	Chikungunya
COI	Citocromo oxidasa subunidad I
DENV	Virus del dengue
EEEV	Virus de la encefalitis equina del este
EN	Encierro de animales
EVS	Trampas de monitoreo de vectores de encefalitis
HG	Trampas CDC para hembras grávidas
MADV	Virus Madariaga
OV	Ovitrampas
PE	Peridomiciliar
SLEV	Virus de la Encefalitis de San Luis
TIM	Tasa de Infección Mínima
VEEV	Virus de la encefalitis equina venezolana
WNV	West Nile virus,Virus del oeste del Nilo
YFV	Yellow fever virus, Virus de la fiebre amarilla
ZIKV	Virus Zika

Resumen

Los arbovirus son virus que se transmiten al ser humano y los animales a través de un artrópodo vector. Los mosquitos son los vectores de arbovirus más importantes a nivel mundial. En el continente Americano son vectores de una gran cantidad de arbovirus incluidos en dos principales géneros virales: *Flavivirus* (virus del dengue, virus del Zika, virus de la fiebre amarilla, virus del oeste del Nilo) y *Alfavirus* (virus de chikungunya, virus de la encefalitis equina venezolana y virus de Madariaga). No obstante, en Costa Rica no se ha investigado en profundidad cuáles son las especies de mosquito que puedan funcionar como vector para estos arbovirus, principalmente los que tienen un ciclo zoonótico.

En el presente estudio, se realizó un muestreo en dos zonas de Costa Rica con evidencia de circulación para diferentes arbovirus zoonóticos. Una zona fue el distrito de Cuajiniquil en la provincia de Guanacaste, y el otro el cantón de Talamanca en la provincia de Limón. Cada cantón fue muestreado tanto en época lluviosa como en época seca. En cada cantón, se seleccionaron ocho puntos de muestreo y cada uno fue dividido en cuatro áreas diferentes: domiciliar, peridomiciliar, establo y bosque. En cada una de ellas se colocaron cuatro diferentes tipos de trampa: Trampas para vectores de encefalitis, Trampas CDC para hembras grávidas, ovitrampas y trampas para *Aedes* grávidas. También se colectaron larvas de mosquito en sitios naturales de ovipostura. Con los datos de los individuos capturados se calculó la curva de acumulación de especies (Rarefacción de Coleman), la riqueza (Chao2) y la diversidad (Índice de Shannon) en ambos cantones. A los adultos capturados se les realizó RT-PCR para la detección molecular de *Alfavirus* y *Flavivirus.* A las hembras grávidas también se les realizó un RT-PCR para establecer sus preferencias alimentarias. Los productos positivos de todos los PCR y RT-PCR fueron secuenciados para así confirmar su secuencia.

La diversidad y riqueza de especies varió en ambos cantones entre época seca y época lluviosa. La riqueza de especies fue mayor en Talamanca que en Cuajiniquil, no obstante, la diversidad fue mayor en Cuajiniquil. La principal especie capturada en ambos cantones fue *Culex quinquefaciatus.* Asimismo, en esta especie se logró identificar dos individuos positivos para ARN viral de virus del dengue y de virus del Zika. Respecto a las preferencias alimentarias se detectó sangre de humano y de gallina principalmente. También se detectó sangre de otros animales domésticos y silvestres. Este trabajo permitió establecer una base en cuanto a las especies de mosquito presentes en estas zonas con actividad para diferentes arbovirus. Asimismo, demostró la circulación de diferentes arbovirus en estas zonas. No obstante, ninguna especie se logró incriminar como un potencial vector para un arbovirus zoonótico.

Se necesita más investigación para complementar los hallazgos realizados en este trabajo, y así describir completamente los patrones de transmisión que involucran a estos vectores.

Abstract

Arboviruses are a group of viruses that are transmitted to humans and animals through an arthropod vector. Mosquitoes are the most important arboviral vectors worldwide. In America, mosquitoes function as vectors of several arboviruses. The majority of these arboviruses belong to two different genera *Flavivirus* (dengue virus, Zika virus, yellow fever virus and West Nile virus) and Alfavirus (Chikungunya virus, Venezuelan equine encephalitis virus and Madariaga virus). There has been a lack of research in Costa Rica on which mosquito species can work as vectors of these viruses, specially the zoonotic ones.

In this study, we sampled two different mosquito communities in two different sites in Costa Rica with evidence of arboviral activity. One was the district of Cuajiniquil, located in Guanacaste province, and the other was Talamanca, located in Limón province. We sampled both counties in rainy and dry seasons. We selected 8 different sampling points in each site. Every sampling point was subdivided in 4 different areas: domiciliary, peridomiciliary, pen and forest. We placed traps in all of these areas. The traps used were: Encephalitis vector surveillance traps, CDC traps for gravid females, ovitraps, and gravid *Aedes* traps. Also, mosquito larvae were collected at natural breeding sites. Using the collected data, we estimated the species accumulation curve (Coleman rarefaction), species richness (Chao2) and diversity (Shannon Index) for both sites. We performed the molecular detection of *Alfaviruses* and *Flaviviruses* by RT-PCR on all the adult mosquitoes collected. We also performed a PCR for blood meal identification on all the gravid females collected. All the PCR products were sequenced to correctly identify its DNA.

Diversity and species richness was different between dry and rainy season in both sites. Talamanca had a greater species richness compared to Cuajiniquil. On the other hand, Cuajiniquil had a greater diversity than Talamanca. *Culex quinquefasciatus* was the most frequent specie captured at both sites. Furthermore, we were able to detect ARN from dengue virus and Zika virus in this species. Finally, we were able to identify bloodmeals mainly from humans and chickens. Other domestic and wild animals were also detected. With this study, we were able to identify, at a base level, the different mosquito species in this two counties with arboviral activity. Also we detected the active presence of two different arboviruses and the blood meal preferences of the main mosquitoes at these sites. Nonetheless, we were not able to incriminate any mosquito species as a potential vector for any of these zoonotic arboviruses. More research is needed to correctly assess the arboviral transmission cycles in Costa Rica.

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA

SEP Sistema de Estudios de Posgrado

Autorización para digitalización y comunicación pública de Trabajos Finales de Graduación del Sistema de Estudios de Posgrado en el Repositorio Institucional de la Universidad de Costa Rica.

Yo, Luis Mario Romero Vega, con cédula de identidad 1 1429 0716, en mi condición de autor del TFG titulado Diversidad preferencias alimentarias y prevalencia viral en mosquitas (Diptera: Culicidae) en dos zonas endémicas a arbovirus zoonóticas en Costa Rica

Autorizo a la Universidad de Costa Rica para digitalizar y hacer divulgación pública de forma gratuita de dicho TFG a través del Repositorio Institucional u otro medio electrónico, para ser puesto a disposición del público según lo que establezca el Sistema de Estudios de Posgrado. SI ☐ NO *☒

*En caso de la negativa favor indicar el tiempo de restricción: 2 (dos) año (s).

Este Trabajo Final de Graduación será publicado en formato PDF, o en el formato que en el momento se establezca, de tal forma que el acceso al mismo sea libre, con el fin de permitir la consulta e impresión, pero no su modificación.

Manifiesto que mi Trabajo Final de Graduación fue debidamente subido al sistema digital Kerwá y su contenido corresponde al documento original que sirvió para la obtención de mi título, y que su información no infringe ni violenta ningún derecho a terceros. El TFG además cuenta con el visto bueno de mi Director (a) de Tesis o Tutor (a) y cumplió con lo establecido en la revisión del Formato por parte del Sistema de Estudios de Posgrado.

INFORMACIÓN DEL ESTUDIANTE:

Nombre Completo: Luis Mario Romero Vega

Número de Carné: A95688 Número de cédula: 1 1429 0716

Correo Electrónico: luisma903@gmail.com

Fecha: 16-12-20 Número de teléfono: 88680078

Nombre del Director (a) de Tesis o Tutor (a): Adriana Troyo Rodrigue

Romero Vega L.

FIRMA ESTUDIANTE

Nota: El presente documento constituye una declaración jurada cuyos alcances responden a la Universidad, que se considera suscrita como cierta. Su importancia radica en que permite abreviar procedimientos administrativos, y al mismo tiempo genera una responsabilidad legal para quien declara contrario a la verdad de lo que manifiesta, puede como consecuencia, enfrentar un proceso penal por delito de perjurio, tipificado en el artículo 318 de nuestro Código Penal. Lo anterior implica que el estudiante se vea forzado a realizar su mayor esfuerzo para que no sobre ni falte información ante lo cual se advierte que reposa en la Licencia de Publicación, otro que también puede diligenciar personalmente la gestión de subir el documento en el repositorio digital Kerwá.

Introducción

Los arbovirus son un grupo de virus de importancia médica transmitidos por artrópodos (1, 2). Más de 40 tipos de arbovirus son transmitidos por mosquitos (3, 4). Los arbovirus son un problema de salud pública a nivel global. Entre los de mayor importancia en el continente Americano destacan el virus del dengue (DENV), virus del oeste del Nilo (WNV) y más recientemente los virus chikungunya (CHIKV) y Zika (ZKV) (1, 5, 6). Asimismo, existen otros arbovirus que pueden ocasionar cuadros clínicos severos, como lo son el virus de Madariaga (MADV) y el virus de la encefalitis equina venezolana (VEEV) (7, 8). Algunos de estos arbovirus pueden tener ciclos que involucran animales domésticos, humanos, animales silvestres y mosquitos; tanto en ciclos enzoóticos como en epizootias. Los ciclos enzoóticos son aquellos que involucran a vertebrados no humanos en una determinada región geográfica, mientras que la epizootia es un aumento de la incidencia de un determinado patógeno en animales en una zona geográfica (9).

Los mosquitos pertenecen a la familia Culicidae del orden Diptera. La gran mayoría son insectos hematófagos que utilizan la sangre exclusivamente como aporte de proteínas para la reproducción (10). Las proteínas presentes en la sangre son en su mayoría metabolizadas en vitelina, que es fundamental para el desarrollo de los huevos (11). Esta adaptación es la que permite a algunos patógenos ser transmitidos entre sus hospederos vertebrados, por medio del proceso de ingesta de sangre que realizan los mosquitos.

1.1. Competencia y capacidad vectorial

La capacidad de una especie de mosquito de transmitir un virus está definida por factores extrínsecos e intrínsecos. La capacidad vectorial es el término que comprende los factores extrínsecos, mientras que la competencia vectorial incluye los factores intrínsecos. Tanto capacidad vectorial como competencia vectorial son indispensables para comprender qué define a una determinada especie de mosquito como vector (10). La capacidad vectorial agrupa la relación espacio tiempo entre el hospedero vertebrado y el vector, así como la preferencia de alimentación del vector hacia el vertebrado.

Existen también otros factores ecológicos que interfieren en estas relaciones. Dentro de los factores abióticos que afectan la capacidad vectorial destacan: clima, uso de suelos y

fotoperiodo (12–14). Por otra parte, entre los factores bióticos que afectan la capacidad vectorial se incluyen la densidad vectorial, la duración del ciclo gonadotrófico, la persistencia al alimentarse, las preferencias alimentarias, entre otros (15).

Por otro lado, la competencia vectorial se describe como la combinación del potencial de adquirir la infección de un hospedero virémico, permitir la diseminación y acumulación del virus en las glándulas salivales, y posteriormente ser capaz de transmitir el virus a un nuevo hospedero (10). Durante todo este proceso, existen barreras anatómicas y fisiológicas propias del mosquito que pueden limitar esta diseminación. La primera de ellas es el intestino del mosquito. El virus debe atravesar la matriz periotrófica y los enterocitos del vector para poder diseminarse en la hemolinfa. Sin embargo, en el intestino pueden existir otros factores que limiten la replicación viral. Uno de ellos es la microbiota intestinal, la cual se ha observado que puede secretar péptidos con capacidad antiviral (16). Además, el sistema inmune del mosquito puede secretar compuestos para evitar la infección, como por ejemplo radicales libres de oxígeno (17). Una vez que el virus atraviesa la barrera intestinal debe ser capaz de diseminarse y alcanzar las glándulas salivales. En ese sitio debe ocurrir una replicación a títulos virales elevados para que sean transportados por la saliva del mosquito, logrando así una infección del hospedero vertebrado en el momento de la alimentación. Debido a la complejidad que conlleva medir estos parámetros, la competencia vectorial únicamente puede ser determinada por medio de ensayos *ex situ*. Por ejemplo, para establecer las diferentes especies de mosquitos de California como vectores de WNV, fue necesaria la inoculación y posterior determinación de títulos virales en glándulas salivales para poder establecer su competencia vectorial (18).

Dicho esto, está claro que definir a un mosquito como vector es un proceso complejo, que no se resuelve con una única detección de infección en el campo. Se han sugerido un mínimo de criterios que se deben cumplir para establecer una especie de mosquito como vector: (i) aislamiento del virus en esa determinada especie con prevalencia alta de infección; (ii) preferencias alimentarias que incluyan a un hospedero amplificador conocido; (iii) rango y periodicidad de vuelo que se traslape con la distribución y accesibilidad de un hospedero; (iv) que los periodos de actividad del vector coincidan con los de ocurrencia del virus; (v) competencia vectorial comprobada en el laboratorio (10).

1.2. Flavivirus de importancia en el continente Americano y sus vectores

Flavivirus es un género viral perteneciente a la familia *Flaviviridae*. Los virus de este geenero tienen una distribución mundial y pueden afectar tanto a humanos como animales (19). Algunos flavivirus tienen un ciclo que involucra principalmente a los seres humanos, por lo tanto son considerados antroponóticos. Los virus DENV y ZIKV son los dos principales virus, dentro del género *Flavivirus*, que tienen ciclo antroponótico. No obstante, en su zona geográfica de origen pueden mantener ciclos selváticos en primates no humanos; en el neotrópico se considera que la evidencia serológica y molecular es producto de un *spillback (*infección de DENV circulante en humanos hacia primates sin establecimiento de un ciclo filogeneticamente distinto*)* viral y no del establecimiento de un ciclo selvático (9). Tanto DENV como ZIKV tienen varios vectores dependiendo de su zona. En América, la principal especie vectora de DENV y ZIKV es *Aedes aegypti* Linneaus (20).

Aedes aegypti Linneaus es uno de los vectores de arbovirus más estudiados a nivel mundial (21). Además de ser vector de DENV y ZIKV, también puede transmitir CHKV y el virus de la fiebre amarilla (YFV) en su ciclo urbano (1, 22, 23). Este mosquito es altamente antropofílico y competente para DENV y ZIKV, explicando así su importancia como vector (24). Además de *Ae. aegypti*, existen otros vectores con menor capacidad vectorial, por ejemplo *Aedes albopictus* Skuse. Para DENV (25), la capacidad vectorial de *Ae. albopictus* es menor, pues es menos antropofílico que *Ae. aegypti* (26).

En otros virus, como es el caso del WNV, un mismo vector puede tener papel relevante tanto en el ciclo enzoótico como epizoótico. Por ejemplo, en Estados Unidos de América, durante los meses de primavera y verano, WNV circula entre mosquitos ornitofílicos y aves (6). Durante esta fase, *Culex pipiens* Linnaeus es el principal vector; no obstante, el mosquito cambia su patrón de alimentación a final de verano y pasa de ornitofílico a antropofílico (27). Lo mismo sucede para otras especies de *Culex* en Norteamérica (24, 28–30). Esta es la razón por la cual en humanos los brotes de WNV en Estados Unidos se dan en este periodo de tiempo (27).

Para el YFV, su ciclo en el continente Americano se mantiene entre primates no humanos y mosquitos selváticos (31). En años recientes ha causado importantes brotes en Suramérica (23). Sus principales vectores en América son *Haemagogus janthynomis* Dyar y

Sabethes chloropterus Humboldt (32). Las dos especies son exclusivas de bosque primario y tienen su patrón de vuelo principalmente en el dosel del bosque. Es por ello que YFV afecta principalmente primates no humanos (33). Sin embargo, es importante destacar que YFV también puede ser transmitido por *Ae. aegypti*, por lo que pueden ocurrir brotes y epidemias importantes de este virus en ambientes urbanos (31).

1.3. Alfavirus de importancia en el continente Americano y sus vectores

El género *Alfavirus* pertenece a la familia *Togaviridae* (34). Dentro de este género viral existen virus que pueden causar encefalitis (35) y otros que pueden causar artralgia (1); no obstante el cuadro clínico de estos agentes puede variar ampliamente.

Dentro del grupo de virus causantes de encefalitis destacan el virus de encefalitis equina del este (VEEE), virus de la encefalitis equina del oeste (VEEO), VEEV y MADV. Este grupo de virus mantiene ciclos enzoóticos entre mosquitos y reservorios silvestres: roedores para VEEV y MADV, y aves para VEEE y VEEO. En todos estos agentes pueden darse ciclos epizoóticos.

En el caso de VEEE en su ciclo enzoótico en Norteamérica, las especies que son consideradas vectores son *Aedes vexans* Meigen y otras del género *Culex* (36). Mientras que en el ciclo epizoótico, la especie *Culiseta melanura* Coquillett es encargada de transmitir el virus por su ornitofilia (37). Para VEEV, se sabe que el ciclo epizoótico incluye a las siguientes especies: *Psorophora confinnis* Arribalzaga, *Aedes (Ochlerotatus) sollicitans* Walker, *Aedes (Ochlerotatus) taeniorhynchus* Wiedemann y *Deinocerites pseudes* Dyar & Knab (38). Cabe destacar que el conocimiento ecológico de los vectores en el ciclo enzoótico es escaso. El subgénero *Melanoconion* del género *Culex* es el grupo taxonómico que se ha descrito como el principal vector enzoótico de VEEV (39). A pesar de estar identificado, este es un subgénero cuya ecología es bastante desconocida, en parte por la difícil identificación de los especímenes adultos (40).

1.4. Vectores en Costa Rica

Los géneros *Alfavirus* y *Flavivirus* son dos de los taxones con mayor número de arbovirus de importancia médica y veterinaria (2, 41). En Costa Rica se ha documentado la circulación de virus de ambos géneros. Como parte del género *Flavivirus* se ha reportado la transmisión de DENV (5), ZIKV (42), WNV (43), Virus de la encefalitis de San Luis (SLEV) (44) y, anteriormente, YFV (45). Con respecto a *Alfavirus*, se ha reportado CHIKV (46), VEEV (47) y EEEV (48). Es necesario mencionar que a los linajes suramericanos de EEEV recientemente se les renombró como MADV (8).

Costa Rica es uno de los países con mayor diversidad y endemicidad de mosquitos (49). Actualmente se tienen registradas aproximadamente 185 especies (50). Del total de especies, una pequeña porción ha sido reportada como vector en el país. De ellas, la especie más estudiada en el país ha sido *Ae. aegypti* (51). Esto se debe a su alta eficiencia como vector de DENV, el cual es el arbovirus de mayor incidencia en humanos en Costa Rica (5). Otras especies que también han sido investigadas como vectores en el país son *Ae. albopictus*, una especie globalmente invasiva (52, 53), y *Culex quinquefasciatus* Say (54). No obstante, *Cx. quinquefasciatus* ha sido investigado no por su papel como vector de arbovirus, sino como vector del parásito *Wuchereria bancrofti* (55). Aun así, *Cx. quinquefaciatus* podría ser vector de algunos arbovirus circulantes en el país, por ejemplo WNV, pues ya ha sido propuesto como el principal vector para este virus en Guatemala (56).

En cuanto a vectores selváticos, se ha encontrado que mosquitos del género *Haemagogus* y *Sabethes* fueron abundantes en el dosel de bosque primario en un área endémica para fiebre amarilla en Costa Rica en el año 1951 (57). Entre ellos destacan *Haemagogus spegazzinii* Brethes, *Haemagogus lucifer* Howard, Dyar & Knab, *Haemagogus equinus* Theobald, *Sa. chloropterus*, *Sabethes cyaneus* Fabricius y *Sabethes tarsoupus* Dyar & Knab.

Respecto a vectores de alfavirus zoonóticos, los estudios realizados en Costa Rica se han enfocado principalmente en la zona de Guanacaste. Durante un brote en 1973 de VEEV, se realizaron aislamientos del virus únicamente en *Ae. taeniorhynchus* y *De. pseudes* (47). Entre las otras especies capturadas en la zona, se mencionó a *Culex nigripalpus* Theobald y *Ps. confinnis*, entre otros. En Panamá, recientemente se describió la culicidofauna en una región endémica a VEEV (58). En ese estudio se observó una baja densidad de posibles vectores enzoóticos de este virus. Uno de los vectores con baja densidad fue *Culex*

(Melanoconion) pedroi Sirivanakarn & Belkin. Por otra parte, respecto a alfavirus antroponóticos, *Ae. aegypti* y *Ae. albopictus* pueden ser vectores de CHIKV, y este virus se ha encontrado en varias zonas Costa Rica (59).

1.5. Técnicas de captura de vectores

El método usado para capturar los mosquitos puede influir en los resultados sobre potenciales vectores colectados, ya que cada trampa tiene un uso específico (60). Las trampas CDC de CO_2, al usar dióxido de carbono, atraen de manera inespecífica a los mosquitos, asimismo, posee una luz incandescente la cual atrae a otras especies con alto fototropismo (61). En relación con otro tipo de trampas como las BG- Sentintel, estas usan cebos especialmente diseñados para asemejarse al olor humano, por lo que no son tan útiles para capturar especies zoofílicas (62). Por otro lado, existen trampas que capturan hembras grávidas. Dos de ellas son las trampas para hembras grávidas tipo CDC o "*CDC Gravid Trap*" (HG) y las trampas para *Aedes* grávidas o "*Biogents Gravid Aedes Trap*" (BGT-GAT), las cuales simulan sitios de ovipostura para atraer a las hembras listas para ovipositar (63). Las trampas HG fueron diseñadas para capturar principalmente especies del género *Culex*, mientras las BGT-GAT para capturas del género *Aedes* (63, 64).

Como parte de la presente investigación, se intentó detectar la presencia de arbovirus de los géneros *Alfavirus* y *Flavivirus* en mosquitos de dos zonas endémicas para arbovirus de Costa Rica: Cuajiniquil y Talamanca. Debido al tipo de trampas y horarios de muestreo establecidos, se capturaron principalmente mosquitos que potencialmente transmiten arbovirus zoonóticos. Además, estas son zonas biogeográficas distintas, ya que Cuajiniquil posee una marcada estación seca debido a sus bajas precipitaciones, mientras que Talamanca tiene una estación lluviosa de 10 meses con disminución de lluvias en los meses de setiembre y octubre (65).

Se espera que los hallazgos de este estudio sean considerados para un mejor control y manejo de las enfermedades causadas por arbovirus, gracias a los aportes básicos en ecología y epidemiología de este estudio.

2. Justificación

Los arbovirus son una preocupación importante a nivel mundial (66). Al ser transmitidos por artrópodos, su incidencia depende de los procesos ecológicos que sufra este grupo de invertebrados. En Costa Rica, los trabajos enfocados en vectores de arbovirus zoonóticos han sido escasos y algunos de ellos son antiguos (47, 57). Actualmente, los vectores de virus como MADV y WNV siguen sin ser estudiados en el país. Existe evidencia serológica de la circulación viral de estos agentes en todo el territorio nacional, con ciertas áreas en tierras bajas que presentan mayor incidencia (67, 68).

Tanto en Cuajiniquil como en Talamanca, que son los sitios de estudio seleccionados, se ha descrito la circulación de distintos arbovirus. En Cuajiniquil y alrededores, existe evidencia serológica por medio de ELISA para IgM e IgG en equinos contra VEEV y WNV (48). En 1970 se realizaron aislamientos virales para VEEV en la región Chorotega durante un brote de esta enfermedad (47). Por otro lado, respecto a Talamanca, en el año 2016 en el pueblo de Catarina hubo dos casos de encefalitis en dos menores de edad; en su momento, WNV y VEEV fueron parte de los diagnósticos diferenciales para este brote (69). Para complementar, en el pueblo panameño de Guabito, el cual es fronterizo con Talamanca, se han dado casos confirmados de VEEV (70). Finalmente, tanto como en Cuajiniqul y Talamanca, y alrededores, se ha reportado la circulación de DENV(5), ZIKV(42) y CHIKV(46).

Las especies virales circulantes en una determinada región pueden pertenecer a varios géneros virales. Algunos se pueden caracterizar por medio de aislamientos a partir de pacientes virémicos (5). Sin embargo, los mosquitos funcionan como cuellos de botella del material genético viral (71). Es decir, en ellos se pueden presentar linajes virales que no van a ser detectados en aislamientos clínicos. Por lo tanto, para un correcto abordaje epidemiológico, no sólo es relevante el estudio de virus obtenidos de vertebrados, sino también es necesaria la descripción de los posibles virus circulantes en los vectores.

Al establecer cuáles especies de vectores están involucradas en el ciclo de estos arbovirus, se puede hacer un control epidemiológico más efectivo, pues no todos los mosquitos se controlan de la misma manera (72). Las acciones de control de vectores dependen de factores como su periodo de actividad, si son endofílicos o exofílicos y el tipo y características de hábitat larval. Por lo tanto, al generar datos de cuáles especies de

mosquitos son las involucradas en el ciclo de transmisión de un determinado arbovirus, será más factible evitar o controlar un brote.

3. Hipótesis

La diversidad de especies de mosquitos, prevalencia viral y preferencias alimentarias tienen patrones ecológicos diferentes en dos zonas endémicas con barreras geográficas significativas de Costa Rica.

4. Objetivos

4.1.Objetivo general

Determinar la diversidad de especies, prevalencia viral y preferencias alimentarias de mosquitos posiblemente implicados en la transmisión de arbovirus zoonóticos (*Alfavirus* y *Flavivirus*) durante la época lluviosa y seca en Cuajiniquil y Talamanca, dos zonas con eventos de transmisión de Costa Rica.

4.2. Objetivos específicos

4.2.1. Cuantificar la diversidad y riqueza de las poblaciones de especies de mosquitos de Cuajiniquil y Talamanca, para identificar especies que habiten en zonas asociadas a la transmisión de arbovirus zoonóticos.

4.2.2. Estimar la prevalencia de especies de arbovirus zoonóticos de los géneros *Alfavirus* y *Flavivirus* en los mosquitos, para identificar probables vectores involucrados en el ciclo de transmisión del virus.

4.2.3. Identificar las preferencias alimentarias de mosquitos hembras grávidas para asociar su fuente de alimentación a factores espaciotemporales de la positividad viral, estación y patrones de actividad de los mosquitos en Cuajiniquil y Talamanca.

5. Metodología

5.1. Sitios de muestreo

Los puntos de muestreo fueron establecidos en Cuajiniquil, distrito perteneciente al cantón de Santa Cruz en la provincia de Guanacaste, y en Talamanca, cantón de la provincia de Limón. El área que comprende todos los puntos de muestreo fue aproximadamente de 14,8 km^2 en Cuajiniquil y 229 km^2 en Talamanca.

Se establecieron un total de 16 puntos de muestreo, 8 en Cuajiniquil y 8 Talamanca (Figura 1 y Figura 2; ver anexos). Los puntos de muestreo en Cuajiniquil fueron principalmente de haciendas ganaderas (n=5), el resto fueron dos casas de habitación (n=2) y una granja avícola de pequeña escala (n=1). La composición de los puntos de muestreo en Talamanca fue más heterogénea. Los puntos estaban compuestos por casas de habitación (n=3), haciendas ganaderas de pequeña escala (n=3) y casas de habitación dentro de plantaciones bananeras (n=2). En todos los sitios habitaba al menos una persona en una casa o unidad habitacional. Asimismo, en todos los puntos habitaba al menos un equino, así como gallinas de traspatio. En cada punto también existía la presencia de un parche boscoso para designarlo como el área de bosque (BO), en donde la distancia entre las áreas domiciliares y BO siempre fue mayor a 50 m. EL bosque en Cuajiniquil es del tipo tropical seco al estar ubicado al norte de la vertiente Pacífica (73). De igual el bosque en la vertiente Caribe es catalogado como bosque tropical muy húmedo (73). Las trampas en el área peridomiciliar (PE) se ubicaron a menos de 5 metros de la casa de habitación. Por último, la ubicación con mayor variabilidad fue el establo (ES), ya que dependía en su totalidad de donde estaban ubicados los animales dentro de la propiedad, que en algunos casos era cercano al DO y en otros más cercano a PE. En las figuras 1 y 2 se detalla la distribución espacial de cada sitio de muestreo y en dónde fueron colocadas las diferentes trampas en Cuajiniquil y Talamanca. En todos los puntos se logró efectuar el muestreo tanto en época lluviosa como seca, con excepción de un punto en Talamanca, el cual no pudo ser muestreado una segunda vez en época lluviosa por disposición de los propietarios.

Solo se muestrearon las propiedades que el encargado hubiera firmado un consentimiento informado aprobado por el CEC (acuerdo VI-4050-2017).

En ambos cantones, se muestreó tanto en época lluviosa como en época seca. Las fechas de muestreo fueron entre agosto del 2017 y marzo del 2018 en Cuajiniquil, y mayo del 2018 y noviembre del 2018 en Talamanca. En ambos periodos, se logró un muestreo tanto durante los periodos de mayor y menor precipitación. El periodo de mayor precipitación (época lluviosa) en el distrito de Cuajiniquil va de mayo a diciembre, mientras que en el cantón de Talamanca va de octubre a diciembre. Es importante recalcar que en Cuajiniquil sí existe una época seca marcada, mientras que en Talamanca se da una disminución en las precipitaciones (65).

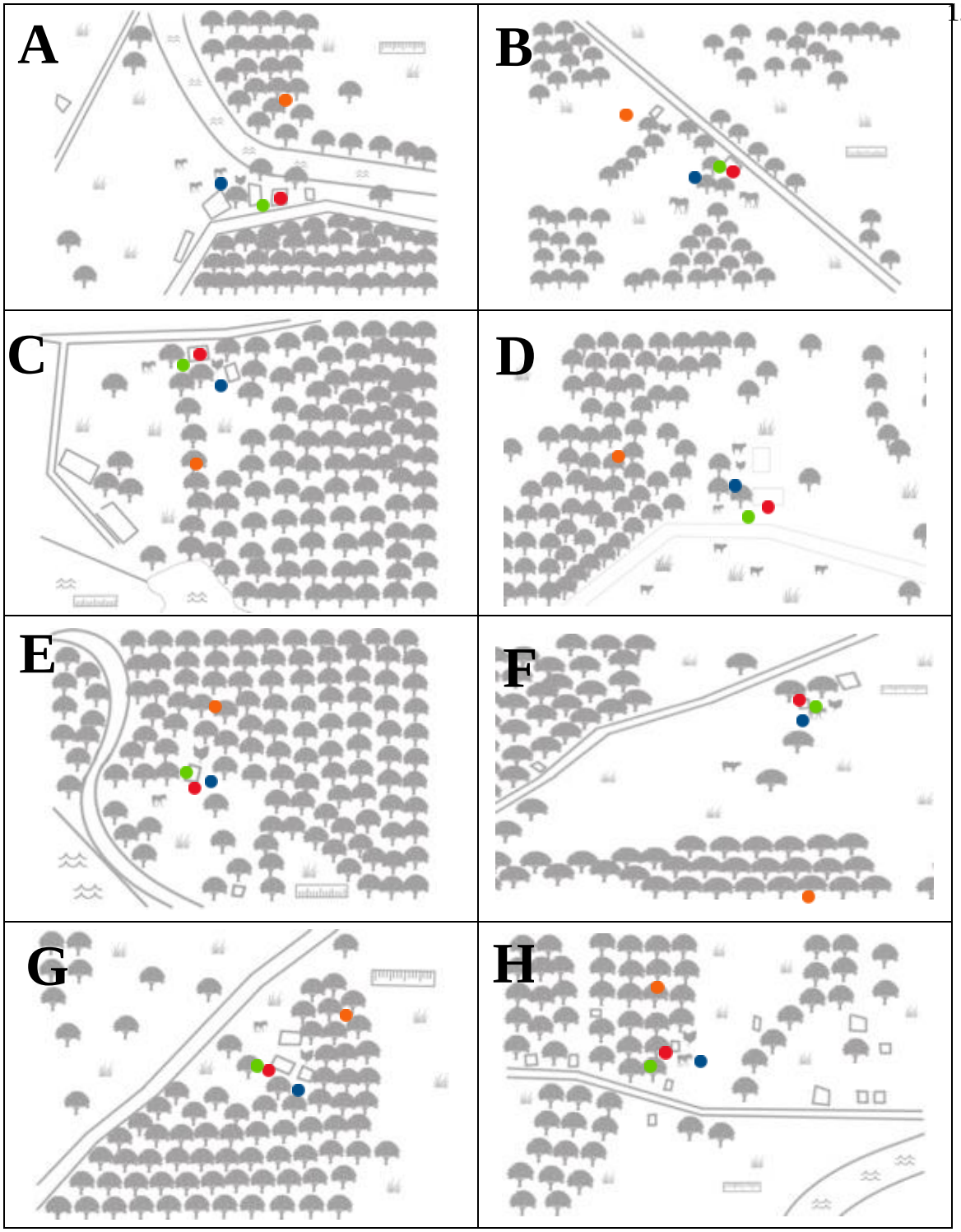

Figura 1. Sitios de muestreo en el distrito de Cuajiniquil. A: CSCA, B: CSCB, C: CSCC, D: CSCD, E: CSCE, F: CSCF, G: CSCG, H: CSCH. Áreas: • Domiciliar, • Peridomiciliar, • Establo y • Bosque. La figura de regla que aparece en cada sitio de muestreo es equivalente a 50 metros.

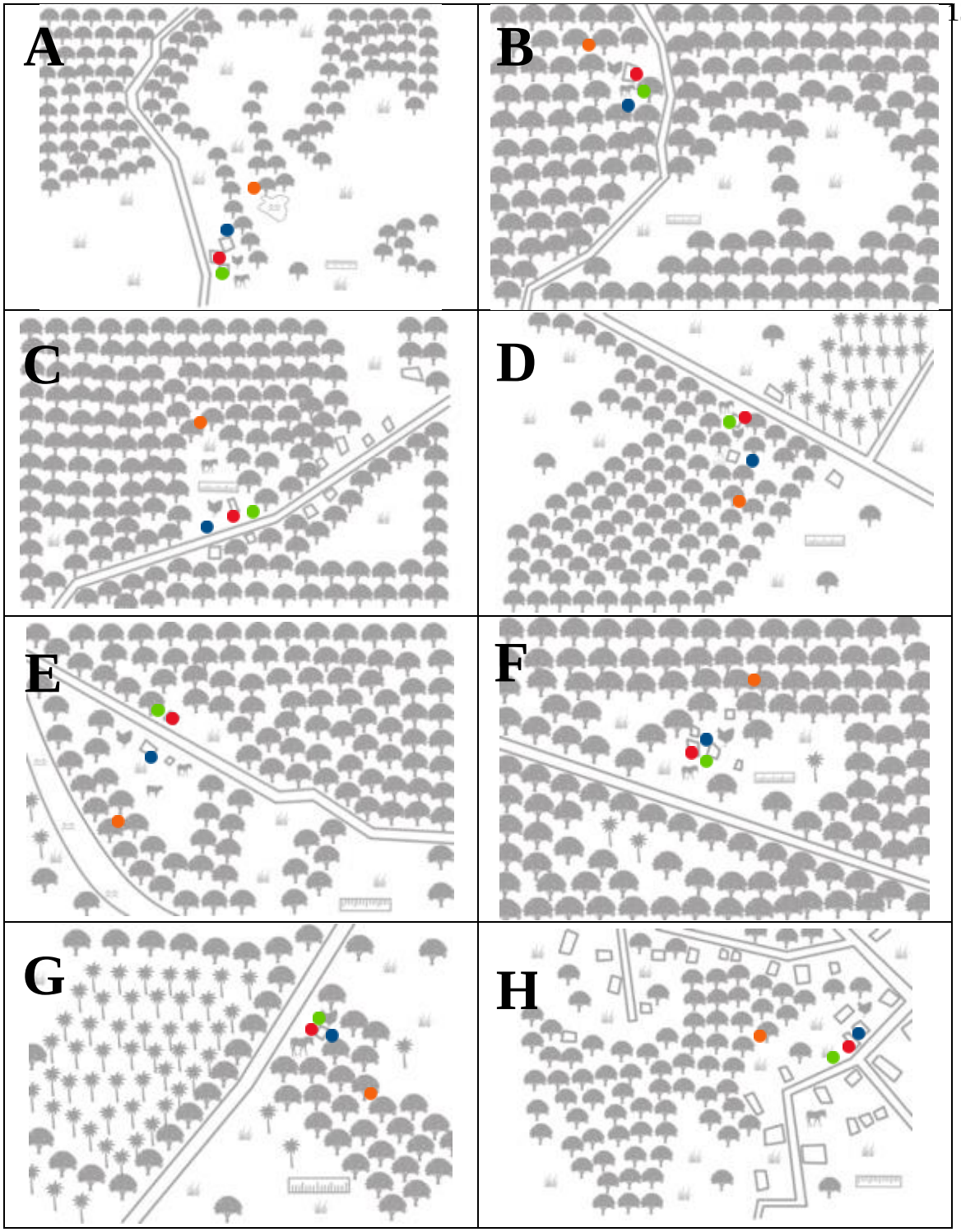

Figura 2. Sitios de muestreo en el cantón de Talamanca. A: CTAA, B: CTAB, C: CTAC, D: CTAD, E: CTAE, F: CTAF, G: CTAG, H: CTAH. Áreas: • Domiciliar, • Peridomiciliar, • Establo y • Bosque. La figura de regla que aparece en cada sitio de muestreo es equivalente a 50 metros.

5.2. Captura de mosquitos

5.2.1. Adultos

La captura de mosquitos adultos se efectuó desde las 18:00 hasta las 06:00 horas. Se utilizaron las trampas "Monitoreo de Vectores de Encefalitis" (EVS) (Bioquip®), CDC para Hembras Grávidas (HG) (Jonh W. Hock®) y trampas para *Aedes* Grávidas (BG-GAT) (Biogents®). Las trampas EVS fueron cebadas con dióxido de carbono a un flujo de 200 ml/min utilizando un regulador de gas CO2 (Bioquip®) y colocadas a una altura de 1,5 metros sobre el nivel del suelo. Las trampas HG y BG-GAT fueron cebadas con una solución de infusión de heno en agua a razón de 1:5. Todas las trampas fueron colocadas en todas las áreas de muestreo excepto por la trampa HG, que no se colocó en el área DO. Tanto las HG como las BG-GAT fueron colocadas a nivel del suelo y a una distancia de dos metros para evitar que una interviniera con la captura de la otra. Posteriormente a la finalización del tiempo de captura, los mosquitos adultos fueron puestos en congelación a -20°C y colocados en tubos cónicos de 15 mL. Su transporte al laboratorio se realizó en hieleras con bolsas de hielo y fueron conservados a – 20º C hasta su identificación.

5.2.2. Larvas

La captura de larvas se realizó utilizando ovitrampas (OV) de latas de aluminio de 330 ml pintadas de negro (74). Se colocaron a un metro de altura en las áreas PE, ESy BO. Se llenaron con 250 mL de infusión de heno diluida 1:5 en agua destilada. Las OV permanecieron en el sitio de muestreo durante dos semanas. Posteriormente, el contenido de la ovitrampa fue vertido en una bandeja blanca de 34,3 x 25,4 cm (Bioquip®) para la visualización y recolección de las larvas. Complementaria a las capturas en OV, se realizó la colecta de larvas en hábitats larvales existentes en los sitios. Los hábitats larvales incluyeron: contenedores artificiales, charcos, arrozales, bebederos de animales y *phytotelmata* (cavidades en plantas terrestres que se llenan con agua). Las larvas colectadas se colocaron en etanol 70% v/v para su conservación y traslado al laboratorio. Para una correcta identificación, las larvas de *Toxorynchites* fueron criadas hasta su fase adulta, ya que tres de las cuatro especies en el país no son identificables a nivel de especie en su fase larval (75).

5.3. Montaje e identificación morfológica

5.3.1. Adultos

El montaje de cada mosquito se realizó de acuerdo con lo recomendado por el Instituto Walter Reed utilizando alfileres, papel triangular y pegamento blanco (76). Para su identificación se utilizó una clave general para mosquitos de Costa Rica y claves específicas para los géneros *Haemagogus*, *Toxorynchites* y *Anopheles* (75, 77–79). Respecto a los mosquitos provenientes de las trampas EVS, se realizaron *pooles* de la misma especie,incluyendo machos, por área y punto de muestreo, con un máximo de 20 individuos. Los *pooles* fueron colocados en tubos cónicos de microcentrífuga de 2 mL con 500 µL de RNALater™ (Thermo Scientific®) y mezclados vigorosamente durante 30 segundos. Las hembras grávidas provenientes de las trampas HG y BG-GAT fueron identificadas de la misma manera, no obstante fueron almacenadas en tubos individuales y clasificados de acuerdo con la observación en el estereoscopio de sangre evidente, grávida o vacía.

5.3.2. Larvas

Las larvas fueron montadas utilizando alcohol polivinílico y lactofenol (PVA) (Bioquip®) como medio de montaje y montadas en un portaobjetos, y se utilizó un cubreobjetos circular #2 (Bioquip®). Cada larva fue cortada a nivel del VII segmento del abdomen de acuerdo con el protocolo del Walter Reed Institute (76), para así lograr una correcta lateralización del segmento VIII y posteriores. El resto del cuerpo fue posicionado con el dorso de la larva hacia arriba. Las láminas fueron colocadas en una incubadora a 45ºC hasta el completo endurecimiento del medio PVA. Finamente fueron anilladas con esmalte de uñas para evitar la rehidratación del medio PVA. Se utilizó la clave "Key for Mosquitoes of Costa Rica" para la identificación de las larvas. Las larvas fueron depositadas en la colección de referencia de la Sección de Entomología Médica de la Facultad de Microbiología de la Universidad de Costa Rica.

5.4. Extracción de ácidos nucleicos y transcripción reversa

A los *pooles* de mosquitos capturados con las trampas EVS se les realizó la extracción de ARN utilizando TRIzol Reagent (Invitrogen®) de acuerdo con las instrucciones del

fabricante. Inmediatamente después, se sintetizó el ADN complementario (cDNA) con el kit de transcriptasa reversa RevertAid (Thermo Scientific®). En cada reacción se utilizó 1 μL de Ribolock, 1 μL de RevertAid, 1 μL de Random Primers, 2 μL de dntps, 4 μL de *buffer* de reacción y 11 μL del ARN extraído del *pool*. El ciclo de temperaturas para utilizar fue de 5:00 min a 25°, 1:00 min a 42°C y 5: 00 min a 70°C. El cDNA fue almacenado a -20º C y el ARN restante a -80º C. A los mosquitos provenientes de las trampas GT y BG-GAT con sangre evidente se les extrajo el ARN y ADN utilizando el kit de extracción NucleoSpin Triprep (Macherey-Nagel®) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Posteriormente a la extracción, el cDNA fue sintetizado de acuerdo con lo descrito anteriormente. De igual manera, cDNA fue almacenado a -20º C y el ARN restante a -80º C.

Como control positivo para la extracción de ARN y reacción de síntesis de cDNA, se efectuó la extracción de ARN de un mosquito *Aedes aegypti* cepa Rockefeller alimentado con *Mus musculus*. Con el cDNA de esta hembra, se efectuó un PCR para el gen GADPH murino como control de extracción. Para ellos se utilizaron los *primers* comerciales incluidos en el RevertAid (Thermo Scientific®). Las temperaturas de amplificación fueron 3:00 min a 94°C y 35 ciclos de 30 s a 94°C, 30 s a 58°C y 45 s a 72°C.

Como control a la extracción de ADN se amplificó el Citocromo Oxidasa Subunidad I (COI) utilizando los *primers* HCO 5'-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA-3' y LCO 5'-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3', los cuales amplifican un segmento del COI en metazooarios (80) Las temperaturas de amplificación fueron 1:00 min a 95°C, 35 ciclos de 1:00 min a 95°C, 1:00 min a 55°C y 1:30 a 72°C; finalmente una extensión de 7:00 min a 72°C.

5.5. Detección viral

Para las hembras grávidas provenientes de las trampas HG, no se realizaron grupos y se analizaron de manera individual. Para la detección de *Alfavirus* y *Flavivirus* se utilizarón reacciones de PCR de punto final.

En el caso de *Alfavirus*, se efectuó un PCR anidado. Se utilizaron los *primers* 5’-TTTAAGTTTGGTGCGATGATGAAGTC-3’ y

5’-GCATCTATGATATTGACTTCCATGTT-3’ para la primera reacción y 5’-GGTGCGATGATGAAGTCTGGGATGT-3’ y 5’-CTATGATATTGACTTCCATGTTCATCCA-3’ para la segunda reacción de *Alfavirus* (81). En la mezcla de reacción se utilizaron 12,5 µL de GreenTaq DNA Polymerase Master Mix™ (Fermentas®), 7,5 de agua de grado molecular (Fermentas®), 1 µL de cada *primer* a una concentración de 10 nmolar y 3 µL de la muestra de ADN. Las temperaturas de amplificación para la primera reacción fueron 3:00 min a 95°C, 10 ciclos de 20 s a 95°C, 1:00 min a 55°C y 1:30 a 72°C; y una extensión final de 7:00 min a 72°C. Para la segunda reacción fueron 2:00 min a 92°C, 40 ciclos de 20 s a 95°C, 20 s a 58°C y 20 s a 72°C. El producto final de la reacción fue de 210 pb. El control positivo utilizado para la amplificación por PCR fue cDNA de la cepa vacunal TC-83 del VEEV mantenida en el Laboratorio de Virología de la Facultad de Microbiología de la Universidad de Costa Rica.

Para la detección de *Flavivirus* se utilizó un PCR semianidado utilizando los *primers* cFD2 5’-GTGTCCCAGCCGGCGGTGTCATCAGC-3’ y MAMD 5’-CATGATGGGRAARAGRGARRAG-3’ en la primera reacción y FS778 5’-AARGGHAGYMCDGCHATHTGGT-3’ con cFD2 5’-GTGTCCCAGCCGGCGGTGTCATCAGC-3’ en la segunda reacción (81). En la mezcla de reacción se utilizaron 12,5 µL de GreenTaq DNA Polymerase Master Mix™ (Fermentas®), 7,5 de agua de grado molecular (Fermentas®), 1 µL de cada *primer* a una concentración de 10 nmolar y 3 µL de la muestra de ADN. Las temperaturas de amplificación para la primera reacción fueron 5:00 min a 95°C, 25 ciclos de 1:00 min a 95°C, 1:00 min a 53°C y 1:00 a 72°C; con una extensión final de 7:00 min a 72°C. Para la segunda reacción fueron 5:00 min a 94°C, 35 ciclos de 1:00 min a 94°C, 1:00 min a 54°C y 1:00 a 72°C; y una extensión final de 7:00 min a 72°C. El producto final de la reacción fue de 220 pb. El control positivo utilizado fue cDNA del genotipo Angola de DENV Tipo 1 mantenida en el Laboratorio de Virología de la Facultad de Microbiología de la Universidad de Costa Rica.

Los productos resultantes de ambos protocolos fueron visualizados mediante electroforesis en gel de agarosa 1,5% (Thermo Scientific®) a la cual se le agregó 1 µL de GelRed™ (Biotium®). El medio de *buffer* utilizado en la cámara de electroforesis fue Tris-Borato-EDTA a una concentración de 0,5 X (Thermo Scientific®). Se utilizó una escalera de 100 pb (Thermo Scientific®), así como un control positivo en concordancia con el

protocolo por analizar. En cada pocillo del gel, se cargaron 4 μL de muestra y se efectuó la electroforesis con un voltaje de 120 v durante 30 minutos. Posteriormente, los geles fueron visualizados utilizando luz ultravioleta con una longitud de onda de 340 nm, dando como positivo los pocillos con una banda concordante con el peso molecular del control positivo.

Para la purificación de las muestras positivas, se cargaron 20 μL del restante del producto del PCR junto a 8 μL de ExoSap IT™ (Thermo Scientific®) en un tubo cónico de 0,2 mL. El producto de PCR fue purificado a una temperatura de 37°C por 15:00 min y luego a 80°C por 15:00 min de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El ADN purificado fue secuenciado por metodología de Sanger en una empresa comercial de secuenciación (Macrogen®, Corea del Sur).

5.6. Identificación de fuente de alimentación sanguínea

Las hembras grávidas seleccionadas para el análisis de preferencias alimentarias fueron todas capturadas con las trampas HG y BG-GAT. Del total de hembras grávidas, se realizó la identificación de la preferencia alimentaria en las hembras con sangre evidente con un aproximado de 60 horas post-ingesta (82). Debido a la alta diversidad de especies de vertebrados en Costa Rica, se utilizó un método genérico y no *primers* específicos, que podrían dejar por fuera algunas especies de vertebrados. Para ello, se amplificó un segmento del Citocromo Oxidasa I (COI) vertebrado utilizando los primes ModRepCOIF 5'- TNTTYTCMACYAACCACAAAG A -3' y VertCOI7216R 5'- CAR AAG CTY ATG TTR TTY ATD CG -3' (81). En la mezcla de reacción se utilizaron 12,5 μL de GreenTaq DNA Polymerase Master Mix™ (Fermentas®), 7,5 de agua de grado molecular (Fermentas®), 1 μL de cada *primer* a una concentración de 10 nmolar y 3 μL de la muestra de ADN. Las temperaturas de amplificación para la primera reacción fueron 3:00 min a 94°C, 40 ciclos de 40 s a 94°C, 30 s a 48,5°C y 1:00 a 72°C; con una extensión final de 7:00 min a 72°C. El producto final de la reacción tuvo un tamaño de 244 pb. Los productos de PCR fueron purificados y secuenciados como se describió anteriormente.

5.7. Análisis de datos

5.7.1. Curvas de rarefacción, riqueza de especies y diversidad de especies

El análisis de riqueza y diversidad de especies fue realizado utilizando el *software* EstimateS® Versión 9.1. del Museo de Historia Natural de la Universidad de Colorado. Previamente al procesamiento de los datos, estos fueron tabulados utilizando el *software* Excel® Version 16.38. Los datos fueron cargados al *software* EstimateS® utilizando el formato Tipo 1; de acuerdo con el manual de usuario, este formato es el indicado para datos de abundancia o incidencia proveniente de muestreo por réplicas (83).

La curva de rarefacción se utiliza para graficar la riqueza de especies observadas. La metodología utilizada fue la Curva de rarefacción de Coleman, ya que es la mayormente utilizada en estudios ecológicos. La curva se graficó para las trampas EVS, HG y OV a nivel de localidad, es decir, se incluyeron todas las capturas realizadas en las diferentes zonas y en la época lluviosa y seca para la graficación de la curva. Se decidió incluir todas estas capturas por localidad en una sola curva, ya que la curva de Coleman asume que las muestras están distribuidas de manera mixta, por lo que al fraccionar los datos por zona y época podría alterar la graficación de la curva.

Para el cálculo de la riqueza de especies se utilizó el estimador Chao2 (84). Se decidió utilizar este estimador ya que a diferencia de otros métodos, este tiene una mayor exactitud en calcular las especies "no vistas", es decir, especies que no fueron recolectadas por nuestros métodos de captura. Se estimó la riqueza de especies tanto para las trampas EVS, HG y OV de Cuajiniquil y Talamanca, considerando todas las especies capturadas en la época lluviosa y seca, así como en las cuatro diferentes zonas de captura. Respecto a los valores utilizados en el *software* EstimateS para el cálculo de Chao2, se utilizaron los valores preestablecidos por el *software*, realizando así 100 réplicas y el método "no corregido" del estimador Chao2. La elección por el método "no corregido" de Chao2 se debe a la recomendación dada por el *software*, ya que la distribución de la incidencia es mayor a 0,5 por lo que se recomienda esta opción para una estimación más acertada (83).

La estimación de la diversidad se calculó utilizando el Índice de Diversidad de Shannon (83). Esta metodología permite cuantificar la diversidad presente en una comunidad. Un valor más alto del índice indica que la diversidad en este sitio es mayor. A diferencia del estimador de riqueza de especies Chao2 que interpreta los datos como ausencia/presencia, el Índice de Shannon considera la homogeneidad de la comunidad, por lo que una estimación alta de la

riqueza de especies no se correlaciona necesariamente con un Índice de Shannon alto. Para establecer esta diversidad general, se realizó la estimación de diversidad considerando todas las especies capturadas, tanto en época lluviosa como en época seca. Para la estimación de la época lluviosa y seca se consideraron los individuos capturados en cada época. Finalmente, para el cálculo de la diversidad por área de captura se incluyeron los individuos capturados en cada área por localidad. El Índice de Diversidad de Shannon se calculó únicamente con los datos colectados con las trampas EVS, ya que estas fueron las que tuvieron una mayor riqueza de especies. Asimismo, se hizo un cálculo total de diversidad para ambas localidades, así como para ambas estaciones y las zonas dentro de los diferentes sitios (DO, PE, ES y BO).

Los datos de especies capturadas por colecta manual no fueron incluidos en los análisis de riqueza de especies y diversidad de especie, ya que los números totales de larvas no fueron cuantificados por no haber sido colectados de manera estandarizada. Los datos provenientes de estas colectas fueron discutidos únicamente de manera cualitativa en relación con los mosquitos.

5.7.2. Preferencias alimentarias

Las secuencias obtenidas fueron procesadas utilizando el *software* MEGA X para así obtener una secuencia consenso de la muestra sentido y asentido. La secuencia consenso de cada muestra fue comparada utilizando la herramienta BLAST™. Para una identificación correcta mediante el uso de BLAST®, se consideró que la secuencia debería tener más de un 90% de similitud respecto a una secuencia ya identificada en GeneBank®. Asimismo, la especie se asoció a la secuencia comparada con un menor E-Value, es decir, que las probabilidades de que esa asociación fueran al azar, fueran menores (85).

5.7.3. Positividad viral

De igual manera, las secuencias obtenidas producto de los PCR para positividad viral fueron procesadas utilizando el *software* MEGA X, para obtener una secuencia consenso de las secuencias sentido y asentido. Para asociar una secuencia consenso a un virus determinado, se estableció que tuviera el porcentaje de similitud más alto. Asimismo, la

identidad se asoció a la secuencia comparada con un menor E-Value, es decir, que las posibilidades de que esa asociación fuera al azar, fueran menores.

5.7.4. Tasa de infección mínima

Para el cálculo de la Tasa Mínima de Infección (TMI), se utilizó una metodología que contemple el cálculo en grupos o *pooles* de diferente tamaño para arbovirus que se estimen en baja prevalencia (86, 87). Por lo tanto, la TIM es la mejor forma metodológica para calcular la prevalencia en virus que se estiman son raros (88), ya que no tiende a sobreestimar los valores de la prevalencia. La TMI se estimó en el *software* Excel utilizando el complemento PooledInfRate, Version 4.0 desarrollado por el Centro de Control de Enfermedades de Estados Unidos (89). El cálculo fue realizado para las especies positivas por localidad, ya que es esperable que las tasas de infección varíen por zonas geográficas.

6. Resultados

6.1. Captura e identificación de mosquitos

Se capturaron un total de 1802 individuos de mosquitos pertenecientes a 55 especies. El esfuerzo de captura fue en total de 128 noches trampa para las trampas EVS y BG-GAT, mientras que para las HG fue de 96 noches trampa, debido a que no se colocaron trampas HG en el área ID. Cada ovitrampa fue colocada en el sitio durante aproximadamente 15 días, para un esfuerzo de captura de 1500 días.

En las trampas EVS se capturaron un total de 1313 individuos de mosquitos. La especie capturada en mayor abundancia en las trampas EVS fue *Culex quinquefasciatus* (n=446) en ambos cantones, siendo de igual manera el género *Culex* el más común. Con estas trampas, el género *Anopheles* se capturó de manera abundante en Cuajiniquil (n=79) (cuadro 1), pero no en Talamanca (n=6) (Cuadro 2). Se capturaron 83 mosquitos *Culex* subgénero *Melanoconion* entre los dos sitios de muestreo. Las especies menos comunes en trampas EVS fueron *Trichoprosopon digitatum* (n=1) y *Deinocerites costaricensis* (n=1).

Cuadro 1. Mosquitos capturados en trampas EVS en Cuajiniquil. Cantidad de individuos por época lluviosa o seca, y por área de captura: Intradomiciliar (ID), Peridomiciliar (PE), Establo (ES) y Bosque (BO).

Especies de Mosquito	Estación										Total
	Lluviosa					Seca					
	ID	PE	ES	BO	Total	ID	PE	ES	BO	Total	
Anopheles sp.	0	0	3	0	3	0	0	0	0	0	3
An. albimanus	1	21	9	18	49	0	0	0	0	0	49
An.apicimacula	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1
An. pseudopuctipennis	4	0	3	5	12	0	0	0	5	5	17
An. neomaculipalpus	1	0	1	1	3	0	0	1	0	1	4
An. punctimacula	3	5	1	4	13	0	0	0	0	0	13
Ae. squamipennis	0	2	0	0	2	0	0	0	0	0	2
De. costaricensis	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1
De. pseudes	7	25	9	15	56	2	10	14	49	75	131
De. epitedeus	0	4	0	0	4	0	0	0	0	0	4
Culex sp.	13	0	2	16	31	1	0	0	1	2	33
Cx. restrictor	15	4	9	24	52	0	0	0	0	0	52
Cx. coronator	23	0	5	24	52	1	0	0	1	2	54
Cx. chiresteri	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1	2
Cx. nigripalpus	0	0	8	1	9	0	0	0	0	0	9
Cx. quinquefasciatus	63	5	12	69	149	0	1	2	2	5	154
Cx. mollis	1	0	0	1	2	0	0	0	0	0	2
Cx (Carollia) sp.	0	0	0	0	0	2	0	0	1	3	3
Cx (Meanoconion) sp.	2	1	2	5	10	0	0	0	2	2	12
Cx. (Mel.) taeniopus	1	0	0	1	2	0	0	0	0	0	2
Cx. (Mel.) theobaldi	4	8	0	16	28	0	0	0	0	0	28
Cx. (Mel.) erraticus	1	0	0	1	2	0	0	0	0	0	2
Haemagogus sp.	0	0	0	0	0	0	0	2	1	3	3
Psorophora sp.	0	1	1	1	3	0	0	0	0	0	3
Ps. cilipes	1	0	0	1	2	0	0	0	0	0	2
Ps. confinnis	1	2	4	1	8	0	0	0	0	0	8
Sabethes undosus	1	0	0	1	2	0	0	0	0	0	2
Tricoprosopon digitatum	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1
Uranotaenia coatzalcoalcos	1	0	2	1	4	0	0	0	0	0	4
Total	143	80	71	206	500	7	12	20	62	101	601

Cuadro 2. Mosquitos capturados en trampas EVS en Talamanca. Cantidad de individuos por época lluviosa o seca, y por área de captura: Intradomiciliar (ID), Peridomiciliar (PE), Establo (ES) y Bosque (BO).

Especies de Mosquito	Estación										Total
	Lluviosa					Seca					
	ID	PE	ES	BO	Total	ID	PE	ES	BO	Total	
Ae. aegypti	0	0	2	0	2	0	0	0	0	0	2
Anopheles sp.	1	1	0	3	5	0	0	1	0	1	6
An. aquasalis	0	0	2	0	2	0	0	0	0	0	2
An. apicimacula	0	0	0	3	3	0	0	0	0	0	3
An. neivai	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1
An. neomaculipalpus	0	0	0	0	0	1	0	0	1	2	2
An. vestitipennis	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1
De. pseudes	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1
Co. nigricans	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1
Culex sp.	4	2	3	28	37	1	1	0	6	8	45
Cx. declarator	0	0	0	0	0	1	0	0	1	2	2
Cx. coronator	5	4	8	73	90	0	0	0	2	2	92
Cx. lactator	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1
Cx. nigripalpus	1	1	0	5	7	1	1	3	9	14	21
Cx. quinquefasciatus	95	89	4	13	201	104	34	18	3	159	360
Cx. stigmatosoma	0	2	0	0	2	0	0	0	0	0	2
Cx. pseudostigmatosoma	40	1	11	12	64	0	0	0	0	0	64
Cx. pleuristratus	0	0	2	0	2	0	0	0	0	0	2
Cx. secundus	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1
Cx. (Mel.) spisipes section	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1
Cx. (Mel) sp.	2	1	7	27	37	0	0	0	1	1	38
Haemagogus sp.	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1
Limatus durhamii	1	1	1	4	7	0	1	0	3	4	11
Li. asolleptus	0	0	0	2	2	0	0	0	0	0	2
Mansonia sp.	1	0	0	4	5	0	0	0	0	0	5
Ma. dyari	1	0	2	3	6	1	2	0	0	3	9
Ma. titillans	2	1	3	10	16	1	0	25	10	36	52
Psorophora. ciciliata	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1
Ps. ferox	2	2	1	2	7	0	0	0	0	0	7
Ps. lineata	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1
Shannonia fluvitialis	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1
Wyeomyia sp.	2	0	5	6	13	3	1	0	3	7	20
Wy. complosa	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1
Total	160	106	52	198	516	114	40	47	42	243	759

En total se capturaron un total de 324 individuos con las trampas HG: 90 grávidas (huevos en abdomen), 181 con sangre, 20 machos y el resto fueron hembras sin abdomen distendido. Se capturaron principalmente 5 especies de mosquito, siendo predominantemente del género *Culex* (n=255), con las especies *Cx. quinquefasciatus* (n=126) y *Culex corniger* (n=92). La cantidad de individuos capturados varió notablemente entre época seca y época lluviosa. En la época lluviosa se capturaron 34 individuos en Cuajiniquil y 165 en Talamanca, mientras que en la época seca fueron 37 para Cuajiniquil y 43 para Talamanca (cuadro 3).

Cuadro 3. Especies capturadas utilizando las trampas para hembras grávidas.
Cantidad de individuos por localidad, época lluviosa o seca, y por área de captura: Peridomiciliar (PE), Establo (ES) y Bosque (BO).

Especies de Mosquito	Cuajiniquil						Talamanca						Total
	Lluviosa			Seca			Lluviosa			Seca			
	PE	ES	BO	PE	ES	BO	PE	ES	BO	PE	ES	BO	
Anopheles apicimacula	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1
Anopheles pseudopunctipennis	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1
Aedes aegypti	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	2
Culex sp.	1	0	0	1	1	2	5	0	0	1	0	0	11
Culex corniger	0	0	0	0	0	0	18	55	4	7	7	1	92
Culex coronator	0	0	0	0	0	0	1	0	2	0	0	0	3
Culex nigripalpus	2	1	0	4	0	5	0	2	2	1	0	0	17
Culex quinquefasciatus	0	0	0	18	13	11	33	20	1	19	11	0	126
Culex pseudostigmatosoma	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	2
Culex restrictor	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1
Culex restuans	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Deinocerites pseudes	0	0	0	0	3	2	0	0	0	0	0	0	5
Haemagogus iridicolor	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1
Limatus durhamii	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	2
Psorophora confinnis	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Uranotaenialowii	0	0	2	0	0	0	0	1	4	0	2	0	9
Total	3	1	3	23	20	21	57	80	16	28	21	1	274

Respecto a las trampas BG-GAT se capturaron un total de 48 individuos, pertenecientes a 8 especies diferentes, de los cuales la mayoría fue *De. pseudes* (n=21). No se capturaron individuos de *Ae. aegypti* utilizando esta trampa (cuadro 4).

Cuadro 4. Especies capturadas utilizando las trampas para *Aedes* grávidas BG-GAT. Cantidad de individuos por localidad, época lluviosa o seca, y por área de captura: Intradomiciliar (ID), Peridomiciliar (PE), Establo (ES) y Bosque (BO).

Especies de Mosquito	Cuajiniquil								Talamanca								Total
	Lluviosa				Seca				Lluviosa				Seca				
	ID	PE	ES	BO	ID	PE	ES	BO	ID	PE	ES	BO	ID	PE	ES	BO	
Deinocerites pseudes	0	0	0	0	0	3	18	0	0	0	0	0	0	0	0	0	21
Culex coronator	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	2
Culex restrictor	0	0	0	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4
Culex corniger	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2
Culex quinquefasciatus	0	1	0	0	0	0	2	0	0	0	1	0	3	1	0	0	8
Haemagogus clarkii	0	0	0	0	0	1	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	3
Limatus durhamii	0	0	2	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	5
Trichoprosopon digitatum	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	3
Total	0	3	3	4	0	4	20	2	0	2	2	3	3	2	0	0	48

En las ovitrampas se capturaron un total de 156 larvas pertenecientes a 10 especies diferentes, siendo *Limatus durhamii* (n=93) la especie más abundante. La variación entre época seca y época lluviosa fue importante. En Cuajiniquil se capturaron un total de 10 larvas de mosquito en la época seca y 22 en la época lluviosa. En Talamanca se capturaron 29 larvas en la época seca y 93 en la época lluviosa. De todos los métodos de captura utilizados, este fue el único positivo a las especies *Ae. aegypti* y *Ae. albopictus*. En el cuadro 5 se detallan las especies capturadas. El único mosquito *Culex (Melanoconion)* capturado en ovitrampas fue en la trampa BO de un punto de muestreo en Talamanca.

Cuadro 5. Especies capturadas en ovitrampas en Cuajiniquil y Talamanca. Cantidad de individuos por cantón, época lluviosa o seca, y por área de captura: Peridomiciliar (PE), Establo (ES) y Bosque (BO).

Especies de Mosquito	Cuajiniquil						Talamanca						Total
	Lluvioso			Seco			Lluvioso			Seco			
	PE	ES	BO	PE	EN	BO	PE	ES	BO	PE	EN	BO	
Aedes aegypti	0	1	0	0	10	0	2	0	2	0	0	0	15
Aedes albopictus	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Aedes septemstriatus	0	0	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5
Aedes epactius	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2
Culex (Mel.) psatharus	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	3
Limatus durhamii	1	4	6	0	0	0	39	2	17	1	23	0	93
Limatus asolleptus	0	0	0	0	0	0	5	5	20	0	0	0	30
Toxorhynchites hypoptes	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
Toxorhynchites moctezuma	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	2
Wyeomyia aporomona	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
Total	1	9	11	0	10	0	46	7	40	1	23	5	153

Por medio del muestreo de sitios de hábitats larvales se logró identificar un total de 29 especies pertenecientes a 11 géneros distintos (cuadro 6). Las especies más comunes, de acuerdo con el número de sitios positivos encontrados, fueron *Culex coronator* y *Li. durhamii*. Los sitios larvales muestreados fueron los siguientes:

-Arácea: Brácteas de plantas del género Aracea.

-Arrozales: Plantaciones de arroz.

-Bambú: Brácteas de género Bambusa.

-Bebederos de ganado: Contenedores de cemento con agua para ganado.

-Bromelias: Bromelias ornamentales y bromelias silvestres.

-Charco: Acúmulo de agua de lluvia en el suelo.

-Contenedores plásticos: contenedores de alimentos, botellas plásticas, bolsas plásticas, lonas, tazas de alimentos de perro.

-Hueco de árbol: Orificio donde se acumula agua en un tronco vivo.

-Hueco de cangrejo: Orificio en manglares parcialmente inundados donde habitan cangrejos.

-Laguna: Cuerpo natural de agua permanente sin movimiento.

-Llantas: Neumáticos en desuso.

-Pantano: Terreno con alta vegetación en los cuales el fondo es fangoso y propicia el acúmulo de agua.

-Poza temporal: Acúmulos de agua en cauces de ríos secos.

Cuadro 6. Especies de larvas colectadas en sitios de cría naturales en los cantones de Cuajiniquil y Talamanca.

Sitios de Cría	Sitio de Estudio	Especies identificadas
Arácea	Talamanca	*Johnbelkinia leucopus*
Arrozales	Cuajiniquil	*Anopheles albimanus* *Culex coronator* *Culex theobaldi*
Bambú	Talamanca	*Haemagogus lucifer*
Bebedero	Cuajiniquil	*Culex quinquefasciatus* *Culex coronator*
Bromelia	Cuajiniquil Talamanca	*Wyeomyia abebela* *Culex pleuristriatus* *Culex rejector* *Toxorhynchites superbus*
Charco	Talamanca	*Culex coronator* *Culex nigripalpus* *Culex lactator*
Coco	Talamanca	*Limatus durhamii*
Contenedor plástico	Cuajiniquil Talamanca	*Aedes aegypti* *Aedes septemstriatus* *Culex quinquefasciatus* *Culex mollis* *Culex corniger* *Culex coronator* *Limatus durhamii*
Laguna	Talamanca	*Culex chidesteri* *Mansonia dyari*
Llanta	Cuajiniquil Talamanca	*Culex coronator* *Aedes aegypti* *Culex coronator* *Limatus durhamii*
Hueco de árbol	Talamanca	*Culex coronator* *Haemagogus iridicolor*
Hueco de cangrejo	Cuajiniquil	*Deinocerites pseudes*
Pantano	Talamanca	*Culex aquarius* *Culex conservator* *Uranotaenia coatzacoalcos*
Poza temporal	Cuajiniquil	*Culex mutator* *Culex (Melanoconion*) sp. *Culex conspirator* *Uranotaenia lowii* *Uranotaenia coatzacoalcos*

6.2. Curvas de rarefacción de Coleman

Las curvas de acumulación de especies por rarefacción de Coleman (Figura 3) fueron diferentes según el tipo de trampa y cantón de muestreo. En total, en cada cantón se realizó un esfuerzo de captura de 64 noches trampa para las EVS, 48 para las HG y 48 semanas para las OV. . Las trampas BG-GAT no fueron incluidas en el análisis debido al bajo número de trampas positivas. La variación entre noches y semanas consiste en el tiempo en que fueron puestas en funcionamiento las trampas y el funcionamiento de cada una. Las EVS y HG funcionaron por un periodo de 12 horas en cada sitio de muestreo, mientras que las OV fueron colocadas durante 15 días. Por ello el cambio en las unidades de esfuerzo de captura. En ninguna de las curvas de acumulación de especies se observa que haya alcanzado una asíntota clara. Las trampas EVS y OV de Cuajiniquil y HG de Talamanca mostraron una tendencia al aplanamiento. Por otra parte, las trampas HG de Cuajiniquil y EVS de Talamanca evidencian una baja captura de la riqueza de especies presentes.

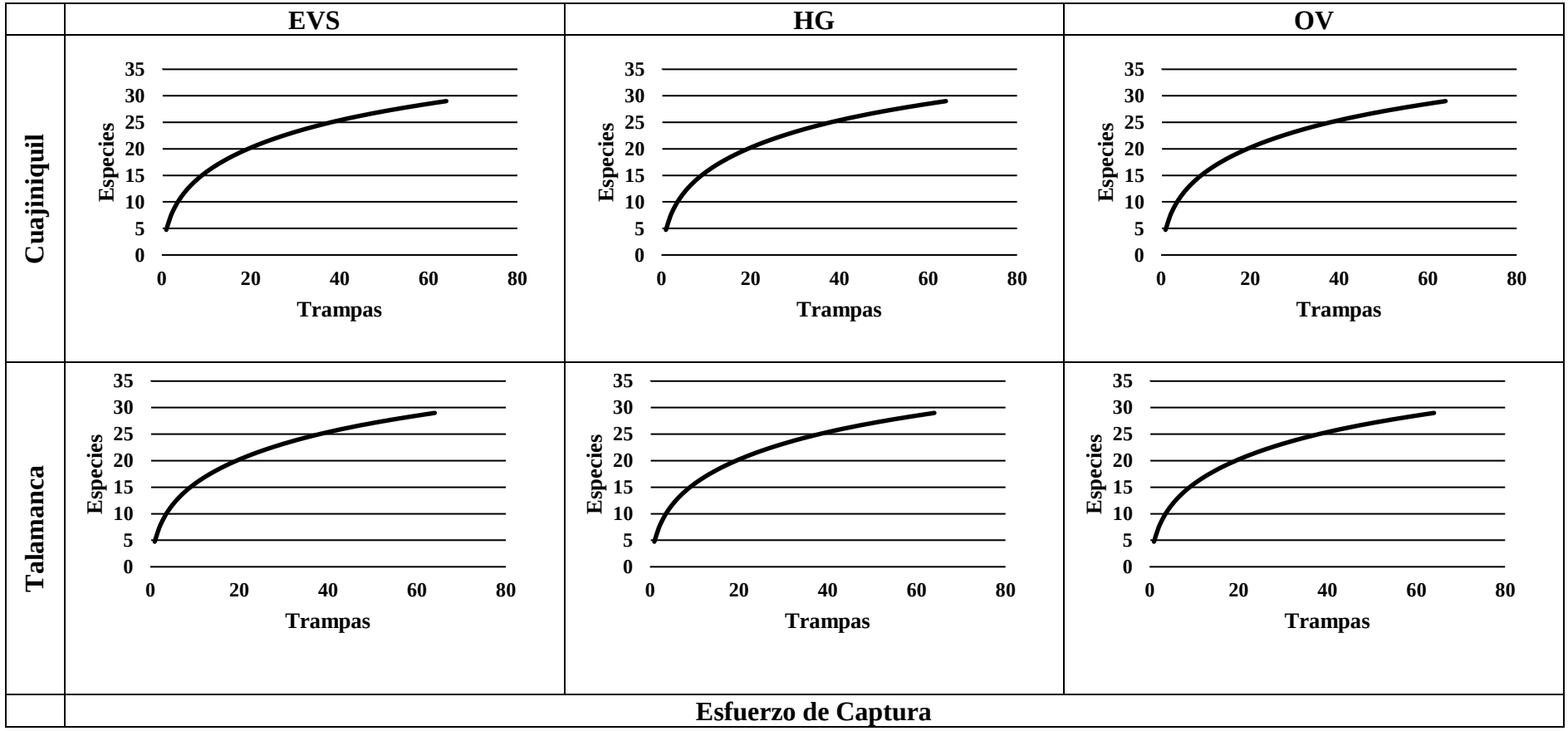

Figura 3. Curvas de rarefacción de Coleman. Las curvas se muestran para las distintas trampas por cantón y el esfuerzo de captura en cada una de ellas: Trampas de monitoreo de vectores de encefalitis (EVS), Trampas CDC para hembras grávidas (HG) y Ovitrampas (OV).

6.3. Estimación de riqueza y diversidad de especies

La riqueza de especies fue calculada para las tres trampas con mayor número de capturas. Las trampas BG-GAT no fueron incluidas en el análisis debido al bajo número de trampas positivas. Al calcular la riqueza de especies por trampa, lo que refleja es el número de especies potencial que puede ser capturado por ese método. El resultado de la estimación del Índice de Chao2 se visualiza en la figura 4. La estimación de riqueza de especies fue mayor en las trampas EVS que en las trampas HG y OV. De todas, la estimación de la riqueza de especies fue mayor en las trampas EVS de Talamanca. La estimación de riqueza de especies varió considerablemente entre los dos cantones. La riqueza de especies estimada para EVS en Talamanca (n=65) fue casi el doble en comparación con Cuajiniquil (n=37,8).

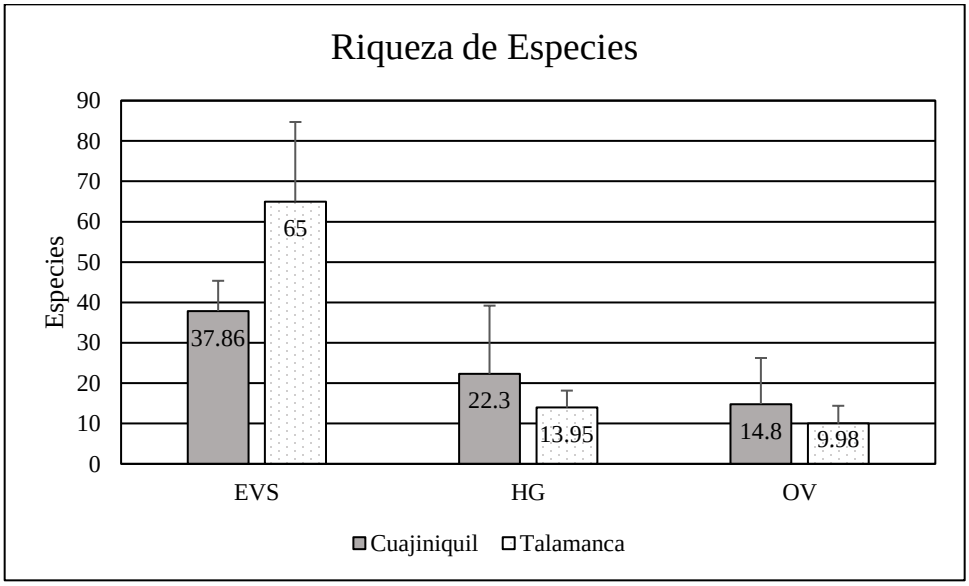

Figura 4. Estimación de la riqueza de especies. Calculada utilizando el estimador Chao2 para los datos de cada trampa en cada cantón.

Según el Índice de Shannon, el cantón con mayor diversidad general fue Cuajiniquil (figura 5). Tanto en Cuajiniquil como en Talamanca, hubo una mayor diversidad de especies en la época lluviosa. La zona más diversa en los sitios de muestreo de Cuajiniquil fue el PE, mientras que en Talamanca fue BO.

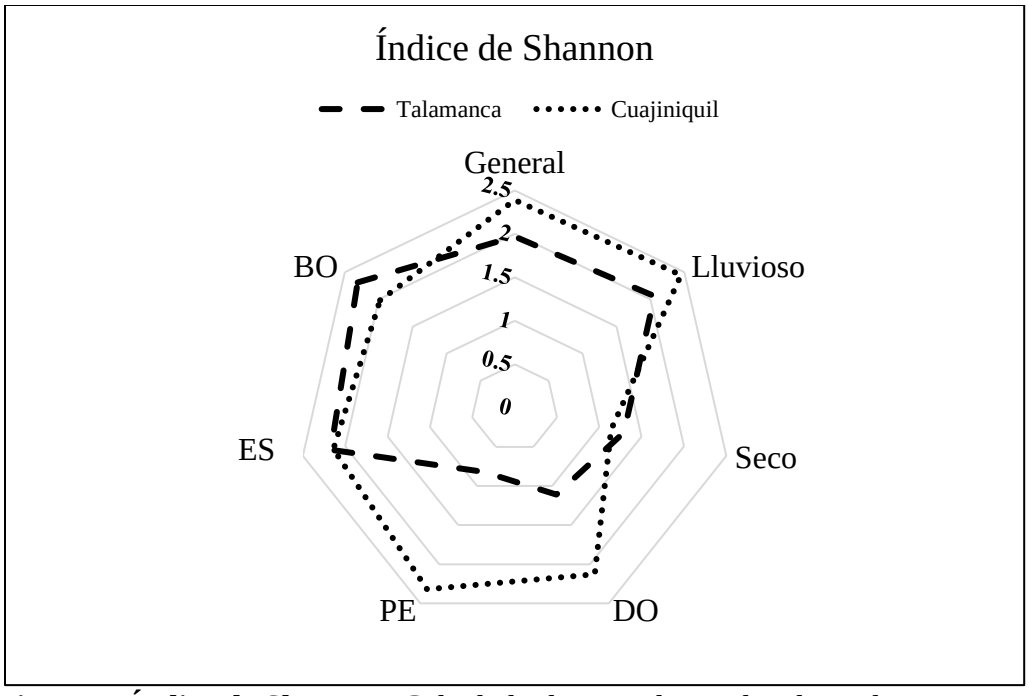

Figura 5. Índice de Shannon. Calculado de acuerdo con los datos de mosquitos capturados para cada cantón por época lluviosa o seca y área de muestreo: Intradomiciliar (DO), Peridomiciliar (PE), Establo (ES) y Bosque (BO).

6.4. Análisis de preferencias alimentarias

Se capturaron un total de 271 hembras grávidas, de las cuales 181 mostraron sangre evidente en su abdomen. La captura de hembras con sangre evidente fue más numerosa en Talamanca (n=142) que en Cuajiniquil (n=39). . De estas, se logró una amplificación de ADN en 79 hembras con sangre evidente, de las cuales 74tuvieron una identificación correcta mediante secuenciación (figura 6). En ambos cantones, el porcentaje de amplificación y secuenciación exitosa fueron similares. En Cuajiniquil secuenció exitosamente el 43,5% (17/39), mientras que en Talamanca fue del 43,6% (62/142). Todos los individuos a los cuales se les logró determinar la preferencia alimentaria pertenecen a la tribu Culicini, específicamente los géneros *Culex* y *Deinocerites*. La especie de mosquito con mayor cantidad de secuencias identificadas fue *Cx. corniger* (n=34) seguida de *Cx. quinquefasciatus* (n=32). También se identificaron preferencias alimentarias de *Cx. coronator* (n=2), *Culex nigripalpus* (n=3) y *De. pseudes* (n=3)

La mayor cantidad de secuencias correspondientes a fuentes de alimentación fueron identificadas como provenientes de *Gallus gallus* (n=46) seguidas de humano (n=19). Se identificó

además sangre de varias especies de animales domésticos, así como un ave silvestre (*Leptotila verrauxi*) y reptiles (*Iguana iguana* y *Anolis* sp.).

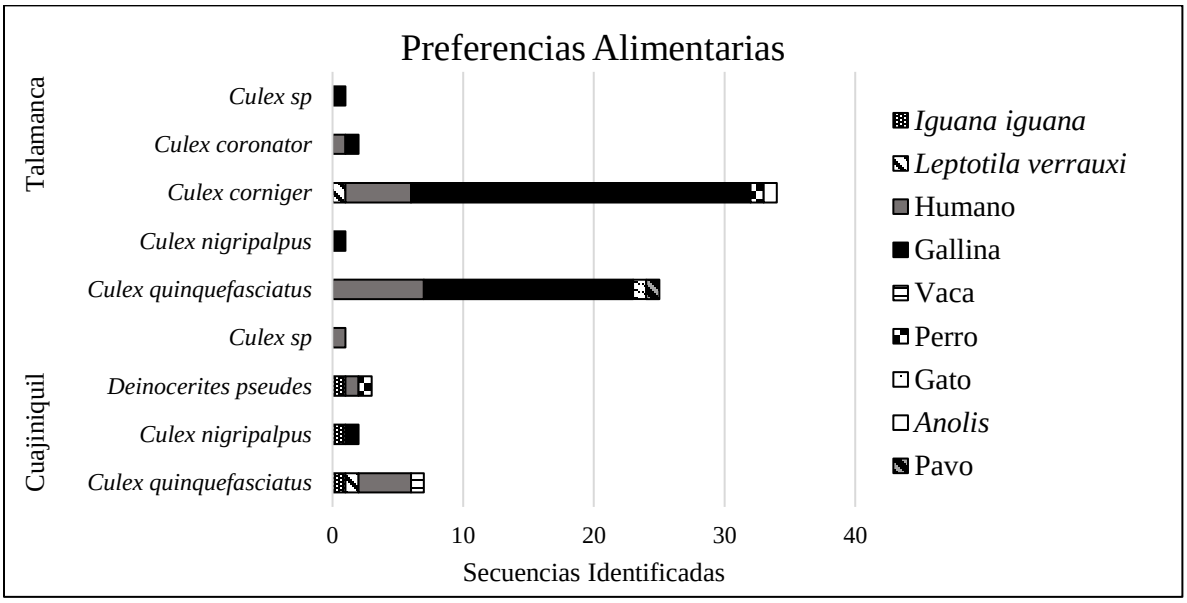

Figura 6. Preferencias alimentarias identificadas en mosquitos de Cuajiniquil y Talamanca.

6.5. Positividad viral

Se detectó ARN viral en un *pool* de mosquitos y una hembra grávida, provenientes de las trampas EVS y HG, respectivamente. El *pool* positivo corresponde a la especie *Cx. quinquefasciatus.* Por otra parte, la hembra positiva en la trampa HG también fue identificada como *Cx. quinquefasciatus*, la cual, es importante destacar, tenía la presencia de sangre humana en su abdomen.

El virus del *pool* positivo proveniente de la trampa EVS fue identificado como ZIKV, mientras que el de la hembra de la trampa HG fue DENV tipo 3. Los códigos de las secuencias en GeneBank® con las cuales fueron comparadas, así como su porcentaje de similitud, se detalla en el cuadro 6. Adicionalmente, en el cuadro 7 se detalla los resultados para el cálculo de la Tasa Mínima de Infección.

Cuadro 6. Positividad viral en *pooles* de mosquitos. La positividad viral se detalla de acuerdo con la trampa: Trampas de monitoreo de vectores de encefalitis (EVS), Trampas CDC para hembras grávidas (HG; Cantón: Cuajiniquil (CU) o Talamanca (TA) y área: peridomiciliar (PE) y bosque (BO).

Especie del *pool*	**Trampa**	**Porcentaje de Identificación en BLAST**	**Secuencia homóloga en BLAST**	**Cantón**	Zona
Culex quinquefasciatus	EVS	ZIKV (97,25%)	MH179341.1	CU	BO
Culex quinquefasciatus	HG	DENV3 (96,7)	MH544650.1	TA	PE

Cuadro 7. Tasa de infección mínima para cada especie de mosquito.

Cantón	**Especie**	**Virus**	**TIM**
Cuajiniquil	*Cx. quinquefasciatus*	ZIKV	0.01
Talamanca	*Cx. quinquefasciatus*	DENV	0.01

7. Discusión

7.1. Especies vectoras y métodos de captura

Las especies de mosquitos capturados por los diferentes métodos de captura fueron variables. A pesar de que no fue uno de los objetivos de este trabajo, fue evidente que la trampa que produjo una mayor captura de individuos y de especies fue la EVS. Esta trampa utiliza CO_2 como método atrayente para los mosquitos. El CO_2 es el principal compuesto que detectan las hembras de mosquito durante la búsqueda de fuentes de alimentación (90), por lo que es un método bastante efectivo y genérico. Una ventaja de utilizar CO_2, en comparación con sitios de ovipostura, es que no existe un sesgo en cuanto al tipo de hábitat larval que puede emplear una determinada especie de mosquito. Por otra parte, las trampas HG y OV se ven limitadas en cuanto a las especies de mosquitos que pueden capturar, debido a que únicamente van a ser útiles para especies con hábitats larvales que estas dos trampas emulen. Por una parte, las trampa HG tiene mayor facilidad de capturar especies que utilicen contenedores artificiales amplios o agua acumulada de tipo charco (91). En cambio, las trampas OV suelen ser mayormente efectivas en especies que habiten normalmente en huecos de árbol o en contenedores artificiales (92). A pesar de esto, las trampas OV en otros estudios han demostrado que puede capturar una diversidad significativa de especies aun en bosques primarios altamente diversos (74).

Según los datos de captura de las trampas HG y EVS, hubo una tendencia a mostrar patrones diferentes a nivel de cantón en cuanto al éxito de captura. En la época lluviosa de Cuajiniquil, la cantidad de individuos capturados con las trampas HG fue muy bajo (n=71); una posible explicación biológica para esto es que en época lluviosa abundan los sitios de ovipostura naturales, por lo que el agua que actúa como cebo en las trampas HG puede no ser percibida como óptima por las hembras de mosquito, en comparación con los sitios naturales de ovipostura (93). Por otra parte, durante la época seca, los sitios de ovipostura naturales y los contenedores artificiales con agua (objetos desechados al aire libre que contengan agua) son muy escasos, por lo tanto, las hembras de mosquitos pueden verse forzadas a escoger las trampas HG como sitio de ovipostura.

En ambos cantones se evidenció la presencia de especies de mosquitos que pueden ser vectores de arbovirus. El género para el cual se recolectó la mayor cantidad de mosquitos adultos fue *Culex*. Este género incluye dos subgéneros que son de importancia médica *Culex*

(Culex) y *Culex* (*Melanoconion).* Dentro del subgénero *Culex (Culex),* las especies de mayor importancia capturadas fueron *Cx. quinquefasciatus, Cx nigripalpus* y *Cx. coronator*. Estas tres especies han sido confirmadas como vectores de WNV en otros países (94, 95). Las tres especies ya han sido ampliamente reportadas en zonas costeras de nuestro país (96). Cebe destacar que en algunos ensayos de *ex situ, Cx. quinquefasciatus* ha demostrado ser un vector competente para ZIKV (97); no obstante, de momento no hay evidencia contundente para considerarlo un vector competitivo en un ciclo de transmisión natural (98).

Respecto al subgénero *Melanoconion*, este es ampliamente reconocido como el principal vector enzoótico de MADV y VEEV (58). En la trampa EVS se logró capturar varias especies de este subgenéro, en la cual destaca *Culex (Melanoconion) theobaldi*. No obstante, no se logró capturar las principales especies vectoras de este subgénero, entre ellas *Culex (Melanoconion) pedroi*.

Dentro de la tribu Culicinii, se logró la captura del género *Deinocerites*. Se capturó un total de tres especies pertenecientes a este género, destacando *Deinocerites pseudes*, la cual ha sido considerada de los vectores epizoóticos más importantes para VEEV en Costa Rica en esta zona (47). Esta especie se capturó en gran número en el cantón de Cuajiniquil (n=124) pero no así en Talamanca (n=1). El hábitat de esta especie, tanto para la fase adulta como larva, está estrechamente asociado a las madrigueras de cangrejo, principalmente en áreas con presencia de mangle (99). Si bien es cierto los casos de VEEV se localizan principalmente en toda la región Chorotega, *De. pseudes* probablemente sea una especie determinante en el ciclo de VEEV cerca de las costas (67).

Respecto a la tribu Adeinii, se capturaron individuos de los géneros *Psorophora* y *Haemagogus*, los cuales incluyen especies vectores de diferentes arbovirus. *Psorophora* es un género importante en el ciclo enzoótico de VEEV, en especial la especie *Ps. confinnis*, la cual ha sido propuesta como vector enzoótico y epizoótico para VEEV (100). Asimismo, el género *Haemagogus* es un género de importancia en el ciclo enzoótico de YFV (32).

En relación con otros grupos de importancia menor, en la tribu Mansoniini, únicamente se capturó el género *Mansonia*, incluyendo a las especies *Mansonia dyari* y *Mansonia titillans. Mansonia titillans* puede ser vectora de VEEV(58). Esta dos especies ya habían sido colectadas anteriormente en la zona (101). No se logró una captura numerosa de especies de la tribu Sabethinii. Entre las especies capturadas con la trampa EVS destacan

Sabethes undosus y *Trichoprosopon digitatum*, las cuales no tienen una importancia médica mayor. Por último, a pesar de no ser vectores de Alfavirus ni Flavivirus, se detectó una presencia importante del género *Anopheles* en Cuajiniquil, principalmente de *Anopheles albimanus*, que es el principal vector de *Plasmodium vivax* en Costa Rica. Cuajiniquil es parte de la región noreste del país que fue históricamente afectada por la transmisión de malaria (102, 103).

En la trampa HG, no se capturó ninguna especie de importancia médica que no haya sido capturada con las trampas EVS. Por otra parte, las trampas BGT-GAT no fueron muy efectivas en la captura de mosquitos. De acuerdo con las instrucciones del fabricante, estas trampas deben ser utilizadas con una franja de papel con pegamento, para que así los mosquitos *Aedes* queden atrapados en ella (104). Debido a que el interés de este estudio era capturar especies de importancia en la transmisión de arbovirus zoonóticos, se decidió eliminar este pegamento ya que podría dañar al espécimen e imposibilitar su identificación debido al desprendimiento de escamas. Este cambio en la metodología de captura hizo que este fuera una prueba de concepto, ya que dichas trampas no fueron diseñadas para operar de esta manera. No obstante, a pesar de que se capturaron mosquitos de interés como *De. pseudes*, el número total fue bajo en comparación con los otros métodos de captura.

Las trampas OV tuvieron gran valor en los muestreos, ya que permitieron capturar especies de importancia médica con actividad diurna. Las especies *Aedes aegypti* y *Ae. albopictus* fueron capturadas por este método. Si bien es cierto, el objetivo de este estudio no era capturar estas especies, su presencia demuestra la complejidad de las comunidades de vectores en un área determinada, demostrando así la necesidad de múltiples metodologías para intentar capturar las especies representativas satisfactoriamente. Asimismo, el uso de este tipo de trampas permitió la captura de *Aedes epactius*, que es de importancia médica debido a la posibilidad de mantener el ciclo enzoótico de SLEV de manera vertical (105). Desde un punto de vista de riqueza de especies, el uso de trampas OV permitió ampliar el número de subgéneros de *Aedes* capturados, ya que se logró la captura de *Aedes septemstriatus*, el cual pertenece al subgénero *Howardina*. Asimismo, las trampas OV evidenciaron la presencia del género *Toxorynchites*, depredadoras naturales de *Ae. aegypti* y *Ae. albopictus* (106, 107); no obstante, este género no es de importancia médica ya que no es hematófago. Además, se logró la captura de *Culex (Mel) psatharus*, la cual de momento no

se ha definido como vector de ningún arbovirus; sin embargo, podría indicar un posible papel como vector por pertenecer al subgénero *Melanoconion.*

Adicionalmente, se logró detectar la presencia de más vectores mediante el muestreo de hábitats larvales. En el género *Aedes* se logró detectar nuevamente la presencia de *Ae. aegypti*. Se detectó la presencia de *Haemagogus iridicolor* en un hueco de árbol, el cual se ha dicho que tiene la capacidad de transmitir YFV a nivel de laboratorio (57). *Haemagogus iridicolor* fue la única especie de importancia médica que no fue capturada con las trampas tipo EVS, HG, BG-GAT y OV, sino que fue la única especie a la cual se capturó manualmente. Anteriormente esta especie también fue capturada mediante colecta manual en la vertiente Atlántica (57)

A partir de este estudio, los arrozales se podrían perfilar como un sitio relevante para el desarrollo de larvas de especies de mosquito de importancia en salud pública, a pesar de que únicamente fue posible muestrear un arrozal en la zona de Cuajiniquil. De las tres especies que se identificaron en este arrozal, *An. aAlbimanus* y *Cx. coronator*, como ya se mencionó, son especies que transmiten *Plasmodium vivax* y WNV respectivamente (94, 108). Asimismo, *Culex (Melanoconion) theobaldi* es reconocido como vector de VEEV (109). Tanto *An. albimanus* como *Cx. coronator* son especies para los cuales se sabe que los arrozales pueden ser un sitio de hábitat larval. Además, se conoce que el subgénero *Melanoconion* también puede habitar este hábitat larval (110). Es destacable que en un solo hábitat larval de origen antropogénico se están reproduciendo tres diferentes mosquitos que pueden ser vectores de tres distintas enfermedades. Por lo tanto, en futuros estudios de enfermedades vectoriales en Guanacaste, se debe tomar en cuenta los arrozales como un hábitat importante para investigar.

En términos generales, el muestreo manual no reveló ningún dato novedoso en cuanto a selección de sitios larvales, ya que todas las especies fueron colectadas en un sitio larval correspondiente a su bionomia larval.

7.2. Estructura de las comunidades de mosquitos

Para considerar que se logró capturar todas las especies capturables en la zona, las curvas de rarefacción deben alcanzar una asíntota evidente. Por lo tanto, en este estudio aún

faltaron especies por capturar en los sitios evaluados (Ver Figura 3). Es importante aclarar que cada tipo de trampa tiene limitaciones en cuanto a las especies que puede capturar y que las curvas variaron mucho entre cada tipo de trampa y entre los cantones estudiados.

De las trampas utilizadas, la que tiene un potencial para capturar un número mayor de especies es la EVS, debido a que utiliza CO_2. No obstante, el esfuerzo de captura no fue capaz de saturar la curva de rarefacción en ninguno de los dos cantones. Además, a pesar de que el CO_2 es altamente efectivo como atrayente, no es el único compuesto que las mosquitos hembra perciben en el ambiente, por lo que en ocasiones podría no ser suficiente el estímulo para atraerlas, como por ejemplo, las hembras de *Ae. aegypti* pueden ser atraídas por CO_2, pero al utilizar otros atrayentes como octenol, la trampa llega a ser más efectiva (62) . Asimismo, es posible que las especies no capturadas no tengan poblaciones estables a lo largo de las dos estaciones, o tienen poblaciones de densidades muy bajas, por lo cual se requería un muestreo más agresivo para su captura, en cuanto a número de noches trampa (111).

Las trampas HG y OV están limitadas por los hábitos de postura de las diferentes especies, en donde puede influir incluso la apertura del orificio o el color del contenedor (74, 112). Las trampas HG no estuvieron cercanas a capturar todas las especies posibles, aunque en Talamanca se aprecia que la pendiente disminuyó un poco al final de la curva, sin lograr aplanarla (Figura 3). Las trampas HG emulan agua empozada, tipo charcos, que son abundantes a lo largo de todo el año en ambos cantones. A pesar de que en Cuajiniquil, durante la época seca, no hay acúmulos de agua causados por lluvias, durante la época seca, los riachuelos de la zona pueden formar pozas temporales al secarse, de acuerdo con lo observado durante las colectas. Por lo tanto, esto podría permitir una riqueza de especies mayor, debido a la presencia de especies que utilicen estos sitios de ovipostura similares

Respecto a la OV, en Cuajiniquil se capturó un número bajo de especies (6 en total), la curva indica que el número de especies capturables con este método no es muy alto en esta zona (Figura 3). Una posible razón podría ser que los sitios de postura que esta trampa emula (contenedores artificiales y huecos de árbol) no son muy utilizados por las especies presentes en la zona, debido a una escasez de estos sitios durante una importante época del año, lo que resulta en pocas especies que dependen de este tipo de sitios. En otros estudios se ha observado que las OV atrapan principalmente especies de mosquitos que utilicen contenedores artificiales, huecos de árbol y bambú (74, 113). Por otra parte, en Talamanca

las trampas OV no alcanzaron la asíntota a pesar de haber capturado un total similar (7 especies) (Figura 3). Esto sugiere que la riqueza de especies que utilicen este tipo de sitio de ovipostura es mayor en Talamanca que en Cuajiniquil. En Talamanca es más probable que existan más especies que utilicen huecos de árboles o contenedores plásticos, ya que se podrían mantener con agua más tiempo por ser una zona sin una estación seca pronunciada. En Costa Rica, en un estudio similar en la vertiente Atlántica utilizando OV, se capturó un total de ocho especies de mosquito. En este caso, el esfuerzo de captura fue de tres semanas, lo que posiblemente permitió alcanzar la asíntota (74).

7.2.1. Estimación de riqueza

Las variaciones en la riqueza (Figura 4) de especies pueden ser múltiples y resulta especulativa, ya que son factores que no se midieron en el presente estudio; no obstante, es importante discutirlos. Una de las principales causas podría ser la homogeneidad de los sitios de muestreo en Cuajiniquil. En este cantón, los parches boscosos seleccionados eran de bosque secundario joven en todos los casos, lo que disminuye la posibilidad de que diferentes especies encuentren un nicho ecológico, ya que la modificación del hábitat tiende a reducir la riqueza de especies (114–116). No obstante, esta relación se invierte con las trampas HG y OV, por lo que se deben investigar a futuro en los factores bióticos y abióticos que puedan explicar esta diferencia a nivel de cantón. Empero, al ser la trampa EVS la más generalista, es decir con mayor capacidad de capturar diferentes especies, sería correcto pensar que Talamanca tiene una riqueza de especies mayor que Cuajiniquil.

7.2.2. Diversidad de especies

Antes de discutir los valores del Índice de Shannon, es importante recalcar que, al realizarlo para un subconjunto de datos, los índices de diversidad no son comparables entre sí, debido al cambio en el esfuerzo de captura (Figura 5). Es decir, únicamente se pueden comparar los índices ya sea entre cantones, entre estaciones de un mismo cantón o entre zonas de captura en un mismo cantón. Respecto a los índices de diversidad generales, es

decir, a nivel de cantón considerando época lluviosa y seca, Cuajiniquil fue más diverso. Esto contrasta con la riqueza de especies en donde Talamanca tuvo un número mayor de especies. Este dato se puede deber a que la comunidad de mosquitos en Cuajiniquil es más homogénea, es decir, tiene menos especies "raras" o especies que se encuentren en bajo número. Que una comunidad tenga una alta riqueza de especies no la hace necesariamente más diversa, ya que muchas de estas especies pueden estar en números bajos o representadas por un único individuo en el muestreo.

En ambos cantones, la época lluviosa fue más diversa que la época seca. Probablemente la diferencia tan marcada se deba a que en la época lluviosa aumenta virtualmente la disponibilidad de todos los sitios de ovipostura, por lo que especies que se mantienen en bajos números en la época seca pueden aumentar, haciendo más homogénea la comunidad. Además, esta diferencia no se debe únicamente al aumento de la homogeneidad, sino también a que la riqueza de especies aumenta durante la época lluviosa. Por lo tanto, esta diferencia de diversidad se da debido a cambios en la homogeneidad y riqueza de especies (14).

Recapitulando, la diversidad en las distintas zonas de muestreo, las zonas DO, PE y ES fueron más diversas en Cuajiniquil que en Talamanca. Los índices de diversidad en las cuatro zonas de Cuajiniquil fueron bastante similares a diferencia de las zonas evaluadas de Talamanca. Una posible hipótesis para esto podría ser que la comunidad de mosquitos en Cuajiniquil está circulando entre las cuatro zonas de estudio. Diferente es la situación en Talamanca, ya que la diversidad es relativamente baja en DO y PE pero aumenta en ES, llegando a tener un número mayor en BO. La caracterización de los parches boscosos no era el objetivo en este estudio, pero podría ser un factor importante para tomar en cuenta en una explicación más certera de los cambios de diversidad entre las distintas zonas de Cuajiniquil y Talamanca. A pesar de que la relación entre diversidad y patógenos ha sido modelada extensamente, las relaciones entre diversidad y presencia de patógenos raramente han sido medidas con éxito empíricamente (117).

7.3. Preferencias alimentarias

Los resultados sobre las preferencias alimentarias de mosquitos en las zonas de estudio, a pesar de que se limitaron a los géneros *Culex* y *Deinocerites*, coinciden con otros estudios

realizados en ambientes similares. Tanto el género *Culex* como *Deinocerites*, se ha demostrado que pueden alimentarse de múltiples fuentes (118, 119). En otros estudios en ambientes similares, la proporción de mosquitos *Cx. quinquefaciatus* alimentados a partir de *Gallus gallus* ha sido de un 16 %, mientras que en el presente estudio fue de un 20 % (120). En ocasiones, los mosquitos prefieren a los hospederos que se encuentran en grupos, por lo que los grupos de *G. gallus* presentes en los patios de las casas pueden ser altamente atractivos para las hembras (121). A pesar de obtener un porcentaje alto de individuos alimentados por sangre de ave, en el presente estudio no se evidenció un porcentaje alto de aves silvestres. La única especie de ave silvestre representada fue *Leptotila verrauxi*. En un estudio en Puerto Rico, se detectó que *Cx. quinquefasciatus* prefiere aves no paseriformes y reptiles (122). No obstante, *Cx. quinquefaciatus* es una especie que puede adaptarse a varias fuentes de alimentación, según su disponibilidad. El hecho de que los mosquitos se alimenten ampliamente de *G. gallus* puede poner a esta especie de ave como una posible zooprofilaxis, ya que esta especie no es un huésped enzoótico efectivo en los ciclos de arbovirus (123–126).

En cuatro especies de mosquitos se evidenció la presencia de sangre de reptil, específicamente de iguana (*Iguana iguana)* y lagartija (*Anolis* sp.), lo que podría coincidir con la idea de que algunos reptiles pueden estar involucrados en los ciclos de transmisión de arbovirus (127); sin embargo, este tipo de estudios no se han realizado extensivamente en el neotrópico. Además, como todas las especies de mosquito (para las cuales se identificó la fuente de sangre) tuvieron al menos un individuo positivo para sangre humana, todas estas especies podrían ser consideradas como potenciales vectores de virus al ser humano (siempre y cuando sean vectores competentes). Para *Cx. quinquefasciatus*, *Cx. nigripalpus* y *De. pseudes* ya existe suficiente evidencia de que pueden transmitir virus como WNV y VEEV (18, 99). Con respecto a *Cx. corniger*, esta especie no ha sido tan investigada y no se han descrito en profundidad sus preferencias alimentarias ni su competencia vectorial, por lo que queda abierta la posibilidad de que sea vector de algún arbovirus.

7.4. Prevalencias virales

La detección de virus DENV y ZIKV exclusivamente en mosquitos *Cx. quinquefasciatus* fue esperable, debido a lo variado que pueden ser sus preferencias

alimentarias. Existe cierta evidencia científica de que *Cx. quinquefasciatus* tiene competencia vectorial para ZIKV, aunque ya se ha demostrado que su capacidad vectorial *in situ* es casi nula (128, 129). Por esto, la detección de ARN viral en un individuo de *Cx. quinquefasciatus* no lo convierte en un vector, sino que es probable que el virus se encontrara en títulos virales bajos en comparación a una especie competente como *Ae. aegypti* (129).

El individuo positivo a ZIKV fue capturado en la zona BO de Cuajiniquil. A pesar de que esta especie de mosquito no es vector para ZIKV, demuestra la presencia del virus en esta área boscosa, por lo que abre la posibilidad de una circulación viral entre primates no humanos y humanos. Existe evidencia en otros países de que ZIKV puede infectar a primates no humanos de vida libre; no obstante, se necesita más evidencia de campo para sostener esta afirmación (130). Aun así, esta es una posibilidad que necesita investigarse en un futuro, para conocer realmente el papel de las poblaciones de primates no humanos en el ciclo de ZIKV en Costa Rica. La secuencia de ZIKV detectada en este individuo de *Cx. quinquefasciatus*, se asoció utilizando la herramienta BLAST® a una secuencia colombiana de ZIKV, aislada en el año 2015 de un mosquito *Aedes aegypti*. Hasta el 2016, año previo a la detección de esta secuencia, se había establecido que todos los aislamientos de ZIKV en el continente Americano, provenían de un clado único del linaje asiático (131).

En las trampas HG de Talamanca, se detectó un individuo de *Cx. quinquefasciatus* positivo a DENV tipo 3, aunque este tipo de DENV no se detecta en Costa Rica desde el año 2016 (132). No obstante, sí se ha detectado recientemente en Panamá en el 2017, por lo que podría estar relacionado con la detección en Talamanca. El análisis de la secuencia obtenida se asoció con un DENV3 detectado en Colombia en el año 2016. En ese sentido, un estudio filogenético de los aislamientos de DENV en Panamá evidenció que los aislamientos panameños de DENV3 tienen un ancestro común con los aislamientos de DENV3 colombianos (133). Estos corresponden a los aislamientos que se asociaron con la secuencia detectada en Costa Rica, por lo que existe la posibilidad de que este sea una misma cepa que circuló (o circula) en esta zona geográfica. La razón por la cual no se pudo asociar nuestra secuencia con las secuencias panameñas se debe a que en ambos estudios se amplificaron regiones diferentes, mientras que para el DENV colombiano estaba disponible el genoma completo.

El hallazgo de ARN de DENV3 en *Cx quinquefasciatus* no es esperado pues esta especie no transmite el DENV, más bien se podría deber a la ingesta de sangre a partir de un humano virémico, pues se demostró la presencia de sangre humana en su abdomen

Los arbovirus zoonóticos suelen tener tasas de infección bajas en las comunidades de mosquitos por lo que los resultados negativos pueden ser comunes en estudios de este tipo (134, 135).

8. Conclusiones

8.1. Existe una mayor variación en la riqueza de especies entre la estación lluviosa y la seca en Cuajiniquil, en comparación con Talamanca, evidenciando que las variaciones en las comunidades de mosquitos son fluctuantes, y apoyando así la evidencia de que los brotes en esta zona son estacionales.

8.2. La riqueza de especies y diversidad es menor en la época lluviosa en comparación con la época seca en ambas localidades por lo que también apoya la idea de que la estacionalidad de los arbovirus zoonóticos se deba a los cambios en las poblaciones de vectores.

8.3. Se generó evidencia de que existe circulación arboviral entre Panamá y Costa Rica, demostrando así la circulación de arbovirus que no están siendo detectados en Costa Rica.

8.4. Las tasas de infección mínima en estos vectores son bajas, lo que indica que la circulación viral se mantiene baja en estos vectores y probablemente sea fluctuante a lo largo del año, en el sentido de que probablemente aumenta en los momentos que ocurra un ciclo epizoótico.

8.5. Las preferencias alimentarias demuestran que existe una interacción entre mosquitos vectores, posibles reservorios y humanos; por lo tanto, a pesar de que no se haya detectado arbovirus zoonóticos, existe un escenario adecuado para la circulación de estos patógenos.

9. Resumen esquemático

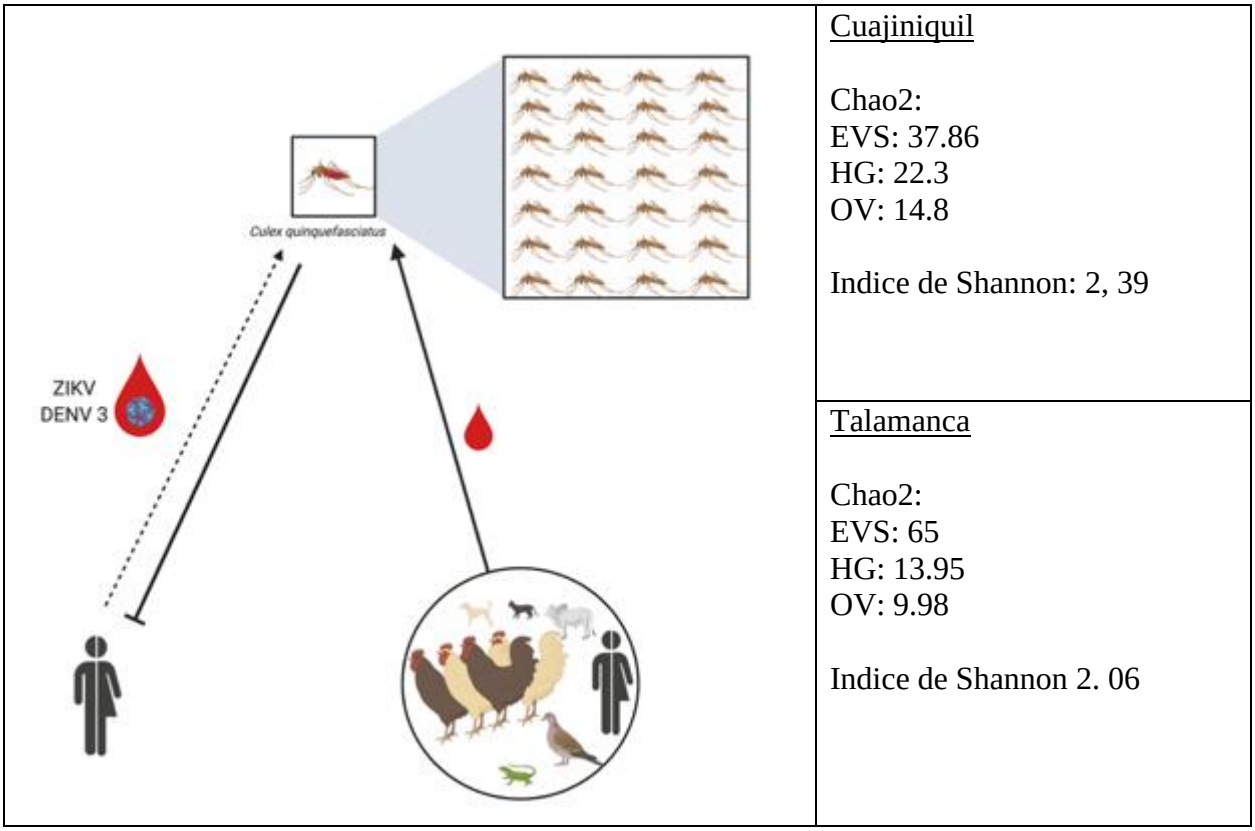

Figura 7. Resumen esquemático. Dentro de la comunidad de mosquitos estudiados, *Culex quinquefasciatus* fue la más relevante. Fue detectada con ARN de ZIKV y DENV 3. Asimismo, se detectó sangre de varios animales domésticos y algunos silvestres.

10. Recomendaciones

10.1. Realizar las capturas diurnas de mosquitos en zonas endémicas para arbovirus zoonóticos, ya que existen vectores que no fueron capturados con las trampas EVS y HG, y que podrían también estar involucrados en el ciclo de estos arbovirus.

10.2. Establecer por parte de las autoridades competentes, un programa de monitoreo activo de mosquitos acompañado de la detección viral de diferentes arbovirus. En este sentido, se debería establecer una cooperación transfronteriza con Panamá, para así colaborar mutuamente con la detección de arbovirus en ambos países.

10.3. Realizar la captura de vectores en momentos de brotes, tanto de humanos como en equinos, para así lograr aumentar las probabilidades de detectar ARN viral en diferentes especies de mosquitos, estableciendo así cuáles son las especies que tienen un papel más importante tanto en el ciclo enzoótico como epizoótico.

10.4. Continuar los estudios de ecología y prevalencia viral en estas zonas, ya que se demostró que son zonas con comunidades diversas de mosquitos, y se necesitan estudios a largo plazo para lograr determinar así el patrón de circulación que tienen estos agentes virales en las comunidades de mosquitos en la zona.

11. Condiciones de Biodiversidad y Financiamiento

Para la ejecución de este proyecto se contó con la aprobación de la Comisión Institucional de Biodiversidad de la Universidad de Costa Rica. El permiso de acceso a la Biodiversidad se detalla en la Resolución #096, en el oficio VI-2994-2017 de la Vicerrectoría de Investigación de la Universidad de Costa Rica con fecha del 16 de mayo del 2017. Además, se contó con el oficio ACT-PIM-070-17 con fecha del 09 de agosto del 2017 del Área de Conservación Tempisque y el oficio R-SINAC-PNI-ACLAC-054-2018 del Área de Conservación la Amistad Caribe. En ambos se aprobó el ingreso y muestreo de mosquitos en zonas pertenecientes a esas áreas de conservación.

El proyecto se financió con los fondos del FEES-CONARE “Dinámica de las arbovirosis en Costa Rica: estudio de vectores (*Aedes aegypti*, *Culex* sp., etc.), reservorios (aves y mamíferos), aspectos virológicos y seroepidemiológicos de Zika, Chikungunya y otros arbovirus en dos localidades endémicas a Dengue, Encefalitis Equina Venezolana y Virus del Oeste del Nilo”, inscrito en la Vicerrectoría de Investigación bajo el código B7362.

12. Referencias

1. Weaver SC, Charlier C, Vasilakis N, Lecuit M. 2018. Zika, Chikungunya, and Other Emerging Vector-Borne Viral Diseases. Annu Rev Med 69:1

2. LaBeaud a. D. 2008. Why arboviruses can be neglected tropical diseases. PLoS Negl Trop Dis 2:1–2.

3. Gould E, Pettersson J, Higgs S, Charrel R, de Lamballerie X. 2017. Emerging arboviruses: Why today? One Heal 4:1–13.

4. Gubler DJ. 2001. Human arbovirus infections worldwide. Ann N Y Acad Sci 951:13–24.

5. Soto-Garita C, Somogyi T, Vicente-Santos A, Corrales-Aguilar E. 2016. Molecular characterization of two major dengue outbreaks in Costa Rica. Am J Trop Med Hyg 95:201–205.

6. Kramer LD, Styer LM, Ebel GD. 2007. A global perspective on the epidemiology of West Nile virus. Annu Rev Entomol 53:61–81.

7. Weaver SC, Ferro C, Barrera R, Boshell J, Navarro J-C. 2004. Venezuelan Equine Encephalitis. Annu Rev Entomol 49:141–174.

8. Vittor AY, Armien B, Gonzalez P, Carrera JP, Dominguez C, Valderrama A, Glass GE, Beltran D, Cisneros J, Wang E, Castillo A, Moreno B, Weaver SC. 2016. Epidemiology of emergent Madariaga encephalitis in a region with Endemic Venezuelan Equine Encephalitis: Initial Host Studies and Human Cross-Sectional Study in Darien, Panama. PLoS Negl Trop Dis 10.

9. Vasilakis N, Cardosa J, Hanley KA, Holmes EC, Weaver SC. 2011. Fever from the forest: prospects for the continued emergence of sylvatic dengue virus and its impact on public health. Nat Rev Microbiol 9:532–541.

10. A.N. C. 2011. The Biology of Mosquitoes. Biol Mosquitoes 3:1–571.

11. Luckhart S, Riehle MA. 2017. Conservation and Convergence of Inmune Signaling Pathways With Mitochondrial Regulation in Vector Artrophod Physiology, p. 15–27. In Wikel, SK, Aksoy, S, Dimopoulos, G (eds.), Arthropod Vector Controller of Disease TransmissionFist. London.

12. Dos Santos Silva J, Alencar J, Costa JM, Seixas-Lorosa E, Guimarães AÉ. 2012. Feeding patterns of mosquitoes (Diptera: Culicidae) in six Brazilian environmental preservation areas. J Vector Ecol 37:342–350.

13. Reisen WK. 2010. Landscape epidemiology of vector-borne diseases. Annu Rev Entomol 55:461–483.

14. Chaves LF, Hamer GL, Walker ED, Brown WM, Ruiz MO, Kitron UD. 2011. Climatic variability and landscape heterogeneity impact urban mosquito diversity and vector abundance and infection. Ecosphere 2:art70.

15. Shaw WR, Catteruccia F. 2018. Vector biology meets disease control: using basic research to fight vector-borne diseases. Nat Microbiol.

16. Jupatanakul N, Sim S, Dimopoulos G. 2014. The insect microbiome modulates vector competence for arboviruses. Viruses 6:4294–4313.

17. Xiao X, Yang L, Pang X, Zhang R, Zhu Y, Wang P, Gao G, Cheng G. 2017. A Mesh–Duox pathway regulates homeostasis in the insect gut. Nat Microbiol 2:17020.

18. Goddard LB, Roth AE, Reisen WK, Scott TW. 2002. Vector competence of California mosquitoes for West Nile virus. Emerg Infect Dis 8:1385–1391.

19. Weaver SC, Reisen WK. 2010. Present and future arboviral threats. Antiviral Res 85:328–345.

20. Souza-Neto JA, Powell JR, Bonizzoni M. 2019. Aedes aegypti vector competence studies: A review. Infect Genet Evol 67:191–209.

21. Nene V, Wortman JR, Lawson D, Haas B, Kodira C, Tu ZJ, Loftus B, Xi Z, Megy K, Grabherr M, Ren Q, Zdobnov EM, Lobo NF, Campbell KS, Brown SE, Bonaldo MF, Zhu J, Sinkins SP, Hogenkamp DG, Amedeo P, Arensburger P, Atkinson PW, Bidwell S, Biedler J, Birney E, Bruggner R V, Costas J, Coy MR, Crabtree J, Crawford M, Debruyn B, Decaprio D, Eiglmeier K, Eisenstadt E, El-Dorry H, Gelbart WM, Gomes SL, Hammond M, Hannick LI, Hogan JR, Holmes MH, Jaffe D, Johnston JS, Kennedy RC, Koo H, Kravitz S, Kriventseva E V, Kulp D, Labutti K, Lee E, Li S, Lovin DD, Mao C, Mauceli E, Menck CFM, Miller JR, Montgomery P, Mori A, Nascimento AL, Naveira HF, Nusbaum C, O'leary S, Orvis J, Pertea M, Quesneville H, Reidenbach KR, Rogers Y-H, Roth CW, Schneider JR, Schatz M, Shumway M, Stanke M, Stinson EO, Tubio JMC, Vanzee JP, Verjovski-Almeida S, Werner D, White O, Wyder S, Zeng Q, Zhao Q, Zhao Y, Hill CA, Raikhel AS, Soares

MB, Knudson DL, Lee NH, Galagan J, Salzberg SL, Paulsen IT, Dimopoulos G, Collins FH, Birren B, Fraser-Liggett CM, Severson DW. 2007. Genome sequence of *Aedes aegypti*, a major arbovirus vector. Science 316:1718–23.

22. Thiboutot MM, Kannan S, Kawalekar OU, Shedlock DJ, Khan AS, Sarangan G, Srikanth P, Weiner DB, Muthumani K. 2010. Chikungunya: A potentially emerging epidemic? PLoS Negl Trop Dis 4.

23. Moreira-Soto A, Torres MC, Lima de Mendonça MC, Mares-Guia MA, dos Santos Rodrigues CD, Fabri AA, dos Santos CC, Machado Araújo ES, Fischer C, Ribeiro Nogueira RM, Drosten C, Sequeira PC, Drexler JF, Bispo de Filippis AM. 2018. Evidence for multiple sylvatic transmission cycles during the 2016-2017 yellow fever virus outbreak, Brazil. Clin Microbiol Infect 2016–2019.

24. Chaves LF, Harrington LC, Keogh CL, Nguyen AM, Kitron UD. 2010. Blood feeding patterns of mosquitoes: Random or structured? Front Zool 7:1–11.

25. H.L. L. 2005. Transovarial transmission of dengue virus in *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in relation to dengue outbreak in an urban area in Malaysia. Dengue Bull 29:106–111.

26. Ponlawat A, Harrington LC. 2005. Blood Feeding Patterns of *Aedes aegypti* and Aedes albopictus in Thailand. J Med Entomol 42:844–849.

27. Kilpatrick AM, Kramer LD, Jones MJ, Marra PP, Daszak P. 2006. West Nile virus epidemics in North America are driven by shifts in mosquito feeding behavior. PLoS Biol 4:606–610.

28. Edman JD, Taylor DJ. 1968. *Culex nigripalpus:* Seasonal shift in the bird-mammal feeding ratio in a mosquito vector of human encephalitis. Science (80-) 161:67–68.

29. Hamer GL, Kitron UD, Goldberg TL, Brawn JD, Loss SR, Ruiz MO, Hayes DB, Walker ED. 2009. Host selection by *Culex pipiens* mosquitoes and West Nile virus amplification. Am J Trop Med Hyg 80:268–278.

30. DAY JF. 2005. Host-Seeking Strategies of Mosquito Disease Vectors. J Am Mosq Control Assoc 21:17–22.

31. Shearer FM, Longbottom J, Browne AJ, Pigott DM, Brady OJ, Kraemer MUG, Marinho F, Yactayo S, de Araújo VEM, da Nóbrega AA, Fullman N, Ray SE, Mosser JF, Stanaway JD, Lim SS, Reiner RC, Moyes CL, Hay SI, Golding N. 2018. Existing and

potential infection risk zones of yellow fever worldwide: a modelling analysis. Lancet Glob Heal 6:e270–e278.

32. Pinto CS, Confalonieri UEC, Mascarenhas BM. 2009. Ecology of *Haemagogus* sp. and *Sabethes* sp. (Diptera: Culicidae) in relation to the microclimates of the Caxiuan National Forest, Para, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz 104:592–598.

33. Moreno ES, Agostini I, Holzmann I, Di Bitetti MS, Oklander LI, Kowalewski MM, Beldomenico PM, Goenaga S, Martínez M, Lestani E, Desbiez ALJ, Miller P. 2015. Yellow fever impact on brown howler monkeys (*Alouatta guariba clamitans*) in Argentina: A metamodelling approach based on population viability analysis and epidemiological dynamics. Mem Inst Oswaldo Cruz 110:865–876.

34. Fields BN, Knipe DM, Howley PM. Fields virology. 2013. Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins.

35. Zacks M a., Paessler S. 2010. Encephalitic alphaviruses. Vet Microbiol 140:281–286.

36. Armstrong PM, Andreadis TG. 2010. Eastern equine encephalitis virus in mosquitoes and their role as bridge vectors. Emerg Infect Dis 16:1869–1874.

37. Molaei G, Oliver J, Andreadis TG, Armstrong PM, Howard JJ. 2006. Molecular identification of blood-meal sources in *Culiseta melanura* and *Culiseta morsitans* from an endemic focus of eastern equine encephalitis virus in New York. Am J Trop Med Hyg 75:1140–7.

38. Deardorff ER, Estrada-Franco JG, Freier JE, Navarro-Lopez R, Da Rosa AT, Tesh RB, Weaver SC. 2011. Candidate vectors and rodent hosts of Venezuelan equine encephalitis virus, Chiapas, 2006-2007. Am J Trop Med Hyg 85:1146–1153.

39. Weaver SC, Ferro C, Barrera R, Boshell J, Navarro J-C. 2004. Venezuelan equine encephalitis. Annu Rev Entomol 49:141–174.

40. Torres-Gutierrez C, Bergo ES, Emerson KJ, de Oliveira TMP, Greni S, Sallum MAM. 2016. Mitochondrial COI gene as a tool in the taxonomy of mosquitoes *Culex* subgenus *Melanoconion*. Acta Trop 164:137–149.

41. Hubálek Z, Rudolf I, Nowotny N. 2014. Arboviruses pathogenic for domestic and wild animalsAdvances in Virus Research.

42. Ministerio de Salud. 2017. Situación Zika Costa Rica.

43. Hobson-Peters J, Arévalo C, Cheah WY, Blitvich BJ, Tan CSE, Sandis A, Araya LN, Hernández JL, Toye P, Hall R a. 2011. Detection of antibodies to west nile virus in horses, Costa Rica, 2004. Vector Borne Zoonotic Dis 11:1081–1084.

44. Medlin S, Deardorff ER, Hanley CS, Vergneau-Grosset C, Siudak-Campfield A, Dallwig R, da Rosa AT, Tesh RB, Martin MP, Weaver SC, Vaughan C, Ramirez O, Sladky KK, Paul-Murphy J. 2016. Serosurvey of selected arboviral pathogens in free-ranging, two-toed sloths (*Choloepus hoffmanni*) and three-toed sloths (*Bradypus variegatus*) in Costa Rica. J Wildl Dis 52:883–892.

45. Romero A, Trejos. A. 1954. Clínica y laboratorio de la Fiebre Amarilla en Costa Rica. Rev Biol Trop 2:113–168.

46. Ministerio de salud. 2017. Situación Chickungunya Costa Rica.

47. Martin DH, Eddy GA, Sudia WD, Reeves WC, Newhouse VF, Johnson KM. 1972. An epidemiologic study of Venezuelan equine encephalomyelitis in Costa Rica, 1970. Am J Epidemiol 95:565–578.

48. Jiménez C, Romero M, Baldi M, Piche M, Alfaro A, Chaves A, Morales J, León B, Hutter S, Corrales E. 2016. Arboviral Infections (Eastern Equine Encephalitis, Western Equine Encephalitis, Venezuelan Equine Encephalitis and West Nile Encephalitis) in horses of Costa Rica. J Equine Vet Sci 39:S31.

49. Foley DH, Rueda LM, Wilkerson RC. 2007. Insight into Global Mosquito Biogeography from Country Species Records. J Med Entomol 44:554–567.

50. Chaverri LG. Culicidae (Mosquitos, Zancudos), p. 396–388. In Brown BV, A, B, JM, C, DM, W, NE, W, MA, Z (eds.), Manual of Central American Diptera, Vol 1. NCRResearch Press, Ontario.

51. Calderón-Arguedas O, Troyo A, Solano ME, Avendaño A, Beier JC. 2009. Urban mosquito species (Diptera: Culicidae) of dengue endemic communities in the greater puntarenas area, Costa Rica. Rev Biol Trop 57:1223–1234.

52. Calderón-arguedas O, Troyo A, Moreira-soto RD, Marín R, Taylor L. 2015. Scientific Note Dengue viruses in *Aedes albopictus* Skuse from a pineapple plantation in Costa Rica 86:184–186.

53. Futami K, Valderrama A, Baldi M, Minakawa N, Rodríguez RM, Chaves LF. 2015. New and common haplotypes shape genetic diversity in asian tiger mosquito populations from Costa Rica and Panamá. J Econ Entomol 108:761–768.

54. Troyo A, Calderón-Arguedas O, Fuller DO, Solano ME, Avendaño A, Arheart KL, Chadee DD, Beier JC. 2008. Seasonal profiles of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) larval habitats in an urban area of Costa Rica with a history of mosquito control. J Vector Ecol 33:76–88.

55. Paniagua F, Garces L, Granados C, Zuiflga A, Ramirez M, Jimenez A, Rica C, Limãn P, Rica C. 1983. Prevalence of Bancroftian filariasis in the city of Puerto Limon and the province of Limon, Costa RICA. Am J Trop Med Hyg 32:1294–1297.

56. Morales-Betoulle ME, Komar N, Panella N a., Alvarez D, López MR, Betoulle JL, Sosa SM, Müller ML, Kilpatrick a. M, Lanciotti RS, Johnson BW, Powers AM, Cordón-Rosales C, Chaluleu C, Contreras CL, Kading RC, Edwards E, Godsey MS, González AS, Huyvaert KP, Keene KM, Ledermann JP, Martínez L, Molina B, De Lourdes Monzón M, Stovall JL, Santiago M, Savage HM, Young G. 2013. West Nile virus ecology in a tropical ecosystem in Guatemala. Am J Trop Med Hyg 88:116–126.

57. Galindo P, Trapido H. 1955. Forest canopy mosquitoes associated with the appearance of sylvan yellow fever in Costa Rica. Am J Trop Med Hyg 4:543–549.

58. Torres R, Samudio R, Carrera JP, Young J, Maârquez R, Hurtado L, Weaver S, Chaves LF, Tesh R, Caâceres L. 2017. Enzootic mosquito vector species at equine encephalitis transmission foci in the República de Panama. PLoS One 12:1–15.

59. Rojas-Araya D, Marín-Rodriguez R, Gutierres-Alvarado M, Romero-vega LM, Calderón-Arguedas O, Troyo A. 2017. Nuevos registros de *Aedes albopictus* (Skuse) en cuatro localidades de Costa Rica. Rev Biomed 28:79–88.

60. Peck GW, Castro-Llanos F, López-Sifuentes VM, Vásquez GM, Lindroth E. 2019. Comparative Analysis of Mosquito Trap Counts In the Peruvian Amazon: Effect of Trap Type and Other Covariates On Counts and Diversity. J Am Mosq Control Assoc 34:291–301.

61. Ritchie SA, Kline DL. 1995. Comparison of CDC and EVS Light Traps Baited with Carbon Dioxide and Octenol for Trapping Mosquitoes in Brisbane, Queensland (Diptera: Culicidae). Aust J Entomol 34:215–218.

62. Unlu I, Farajollahi A. 2014. A Multiyear Surveillance for Aedes albopictus with Biogents Sentinel Trap Counts for Males and Species Composition of Other Mosquito Species . J Am Mosq Control Assoc 30:122–125.

63. Irisha SR, Moorea SJ, Deruac YA, Brucea J, Camerona MM. 2013. Evaluation of gravid traps for the collection of *Culex quinquefasciatus,* a vector of lymphatic filariasis in Tanzania. Trans R Soc Trop Med Hyg 107:15–22.

64. Bazin M, Williams CR. 2018. Mosquito traps for urban surveillance: collection efficacy and potential for use by citizen scientists. J Vector Ecol 43:98–103.

65. IMN. 2017. El Clima y las Regiones Climáticas de Costa Rica. Inst Meterológico Nac Costa Rica.

66. Weaver SC, Barrett ADT. 2004. Transmission cycles, host range, evolution and emergence of arboviral disease. Nat Rev Microbiol 2:789–801.

67. León B, Käsbohrer A, Hutter SE, Baldi M, Firth CL, Romero-Zúñiga JJ, Jiménez C. 2020. National Seroprevalence and Risk Factors for Eastern Equine Encephalitis and Venezuelan Equine Encephalitis in Costa Rica. J Equine Vet Sci 92.

68. Jiménez C, Romero M, Baldi M, Piche M, Alfaro A, Chaves A, Morales JA, León B, Hutter S. 2018. Encefalitis arbovirales en caballos de Costa Rica: 2009-2017. Ciencias Vet 36:27.

69. Avalos A. 2016. Hospital de Niños investiga casos de encefalitis en pueblo de Talamanca. La Nac. San Jose.

70. Quiroz E, Aguilar P V., Cisneros J, Tesh RB, Weaver SC. 2009. Venezuelan equine encephalitis in Panama: Fatal endemic disease and genetic diversity of etiologic viral strains. PLoS Negl Trop Dis 3.

71. Grubaugh ND, Fauver JR, Rückert C, Weger-Lucarelli J, Garcia-Luna S, Murrieta RA, Gendernalik A, Smith DR, Brackney DE, Ebel GD. 2017. Mosquitoes Transmit Unique West Nile Virus Populations during Each Feeding Episode. Cell Rep 19:709–718.

72. Benelli G. 2015. Research in mosquito control: current challenges for a brighter future. Parasitol Res 114:2801–2805.

73. Kappelle M. 2016. Costa Rican Ecosystems. University of Chicago Press.

74. Chaverri, Luis Guillermo, et al. "Mosquito species (Diptera: Culicidae) diversity from ovitraps in a Mesoamerican tropical rainforest." Journal of medical entomology 55.3 (2018): 646-653.

75. Zavortink TJ, Chaverri LG. 2009. Resurrection of the names *Toxorhynchites moctezuma* (Dyar & Jnab) and *Toxorhynchites hypoptes* (Knab) from synonymy with *Toxorhynchites theobaldi* (Dyar & Knab) (Diptera: Culicidae). Proc Entomol Soc Washingt 111:890–897.

76. Gaffigan T, Pecor J. 1997. Collecting, rearing, mounting and shipping mosquitoes. Walter Reed Biosyst Unit, Div Entomol Walter Reed Army Inst Res 1–8.

77. Mallampalli VL, Harbach RE, Peyton EL. 1992. Contributions of the American Entomological Institute. Rev Lit Arts Am 27.

78. Darsie RF. 1993. Key to the Mosquitoes of Costa Rica. University of South Florida.

79. Wilkerson RC, Strickman D. 1990. Illustrated key to the female Anophelinae mosquitoes of Central America and Mexico. J Am Mosq Control Assoc 6:7–34.

80. Folmer O, Black M, Hoeh W, Lutz R, Vrijenhoek R. 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. Mol Mar Biol Biotechnol 3:294–299.

81. Grywna K, Kupfer B, Panning M, Drexler JF, Emmerich P, Drosten C, Kümmerer BM. 2010. Detection of all species of the genus Alphavirus by reverse transcription-PCR with diagnostic sensitivity. J Clin Microbiol 48:3386–3387.

82. Reeves LE, Gillett-Kaufman JL, Kawahara AY, Kaufman PE. 2018. Barcoding blood meals: New vertebrate-specific primer sets for assigning taxonomic identities to host DNA from mosquito blood meals. PLoS Negl Trop Dis 12:e0006767.

83. Colwell RK. 2013. EstimateS: Statistical estimation of species richness and shared species from samples. Version 9 and earlier. User's Guide and application. Publ http//purl oclc org/estimates.

84. Chao A, Chazdon RL, Colwell RK, Shen T-J. A new statistical approach for assessing similarity of species composition with incidence and abundance data. Ecol Lett 8:148–159.

85. Ernieenor FCL, Ahamad M, Haron MS, Ming HT. 2012. Establishment of a molecular tool for blood meal identification in Malaysia. Asian Pac J Trop Biomed 2:223–227.

86. Chiang C, Reeves WC. 1962. Statistical estimation of virus infection rates in mosquito vector populations. Am J Hyg 75.

87. Walter SD, Hildreth SW, Beaty BJ. 1980. Estimation of infection rates in populations of organisms using pools of variable size. Am J Epidemiol 112:124–128.

88. Gu W, Lampman R, Novak RJ. 2003. Problems in estimating mosquito infection rates using minimum infection rate. J Med Entomol 40:595–596.

89. Biggerstaff BJ. 2009. PooledInfRate, Version 4.0: a Microsoft® Office Excel© Add-In to compute prevalence estimates from pooled samples. Centers Dis Control Prev Fort Collins, CO.

90. Cardé RT. 2015. Multi-Cue Integration: How Female Mosquitoes Locate a Human Host. Curr Biol 25:R793–R795.

91. Reiter P. 1983. A portable battery-powered trap for collecting gravid Culex mosquitoes. Mosq News 43:496–498.

92. Romero LM, Chaverri LG, Chaves LF. 2018. Mosquito (Diptera: Culicidae) Species Composition in Ovitraps From a Mesoamerican Tropical Montane Cloud Forest. J Med Entomol 1–10.

93. Bentley MD, Day JF. 1989. Chemical ecology and behavioral aspects of mosquito oviposition. Annu Rev Entomol 34:401–421.

94. Alto BW, Connelly CR, O'Meara GF, Hickman D, Karr N. 2014. Reproductive biology and susceptibility of florida *Culex coronator* to infection with west nile virus. Vector-Borne Zoonotic Dis 14:606–614.

95. Turell MJ, Dohm DJ, Sardelis MR, O'guinn ML, Andreadis TG, Blow JA. 2005. An Update on the Potential of North American Mosquitoes (Diptera: Culicidae) to Transmit West Nile Virus. J Med Entomol 42:57–62.

96. Calderón-Arguedas O, Troyo A, Solano ME, Avendaño A, Beier JC. 2009. Urban mosquito species (Diptera: Culicidae) of dengue endemic communities in the Greater Puntarenas area, Costa Rica. Rev Biol Trop 57:1223–1234.

97. Guo XX, Li CX, Deng YQ, Xing D, Liu QM, Wu Q, Sun AJ, Dong Y De, Cao WC, Qin CF, Zhao TY. 2016. *Culex pipiens quinquefasciatus:* A potential vector to transmit Zika virus. Emerg Microbes Infect 5:e102-5.

98. van den Hurk AF, Hall-Mendelin S, Jansen CC, Higgs S. 2017. Zika virus and *Culex quinquefasciatus* mosquitoes: a tenuous link. Lancet Infect Dis 17:1014–1016.

99. Grayson MA, Galindo P. 1972. Experimental transmission of Venezuelan equine encephalitis virus by *Deinocerites pseudes* Dyar and Knab, 1909. J Med Entomol 9:196–200.

100. Ortiz DI, Weaver SC. 2004. Susceptibility of Psorophora confinnis (Diptera: Culicidae) to Infection with Epizootic (Subtype IC) and Enzootic (Subtype ID) Venezuelan Equine Encephalitis Viruses. J Med Entomol 41:987–993.

101. Kumm HW, Komp WHW, Ruiz H. 1940. The Mosquitoes of Costa Rica. Am J Trop Med Hyg s1-20:385–422.

102. Marín Rodríguez R, Chaves LF. 2019. Parasite Removal for Malaria Elimination in Costa Rica. Trends Parasitol 35:585–588.

103. Chaves LF, Rojas MR, Prado M, Garcés JL, Peraza DS, Rodríguez RM. 2020. Health policy impacts on malaria transmission in Costa Rica. Parasitology 147:999–1007.

104. Cilek JE, Knapp JA, Richardson AG. 2017. Comparative efficiency of biogents gravid *Aedes trap,* CDC autocidal gravid ovitrap, and CDC gravid trap in northeastern Florida. J Am Mosq Control Assoc 33:103–107.

105. Hardy JL, Rosen L, Kramer LD, Presser SB, Shroyer DA, Turell MJ. 1980. Effect of rearing temperature on transovarial transmission of St. Louis encephalitis virus in mosquitoes. Am J Trop Med Hyg 29:963–968.

106. Nyamah MA, Sulaiman S, Omar B. 2011. Field observation on the efficacy of Toxorhynchites splendens (Wiedemann) as a biocontrol agent against *Aedes albopictus* (Skuse) larvae in a cemetery. Trop Biomed 28:312–319.

107. Albeny DS, Martins GF, Andrade MR, Krüger RF, Vilela EF. 2011. *Aedes aegypti* survival in the presence of *Toxorhynchites violaceus* (Diptera: Culicidae) fourth instar larvae. Zoologia 28:538–540.

108. Grieco JP, Achee NL, Roberts DR, Andre RG. 2005. Comparative susceptibility of three species of *Anopheles* from Belize, Central America, to Plasmodium falciparum (NF-54). J Am Mosq Control Assoc 21:279–290.

109. Turell MJ, Dohm DJ, Fernandez R, Calampa C, O'Guinn ML. 2006. Vector competence of Peruvian mosquitoes (Diptera: Culicidae) for a subtype IIIC virus in the Venezuelan equine encephalomyelitis complex isolated from mosquitoes captured in Peru. J Am Mosq Control Assoc 22:70–75.

110. Forattini OP, Kakitani I, Massad E, Marucci D. 1995. Studies on mosquitoes (Diptera : Culicidae) and anthropic environment . 10- Survey of adult behaviour of Culex nigripalpus and other species of *Culex (Culex)* in South-Eastern Brazil *.

111. Wilke ABB, Vasquez C, Medina J, Carvajal A, Petrie W, Beier JC. 2019. Community Composition and Year-round Abundance of Vector Species of Mosquitoes make Miami-Dade County , Florida a Receptive Gateway for Arbovirus entry to the United States 1–10.

112. Allan SA, Kline D. 2004. Evaluation of various attributes of gravid female traps for collection of *Culex* in Florida.

113. Tsuda y, Takagi m, Wada y. 1994. Ecological study on mosquito communities in tree holes in Nagasaki, Japan, with special reference to *Aedes albopictus* (Diptera; Culicidae). Med Entomol Zool 45:103–111.

114. Bonaldo AB, Costa JE, Esposito MC, Ferreira L V, Hawes J, Hernandez MIM, Hoogmoed MS, Leite RN, Malcolm JR, Martins MB. 2007. Quantifying the biodiversity value of tropical primary , secondary , and plantation forests 104:18555–18560.

115. Schulze CH, Waltert M, Kessler PJA, Pitopang R, Veddeler D, Mühlenberg M, Gradstein SR, Leuschner C, Steffan-Dewenter I, Tscharntke T. 2004. Biodiversity indicator groups of tropical land-use systems: comparing plants, birds, and insects. Ecol Appl 14:1321–1333.

116. Tscharntke T, Klein AM, Kruess A, Steffan-Dewenter I, Thies C. 2005. Landscape perspectives on agricultural intensification and biodiversity–ecosystem service management. Ecol Lett 8:857–874.

117. Rohr JR, Civitello DJ, Halliday FW, Hudson PJ, Lafferty KD, Wood CL, Mordecai EA. 2020. Towards common ground in the biodiversity–disease debate. Nat Ecol Evol 4:24–33.

118. Martin DH, Chaniotis BN, Tesh RB. 1973. Host preferences of *Deinocerites pseudes* Dyar & Knab. J Med Entomol 10:206–8.

119. Takken W, Verhulst NO. 2013. Host Preferences of Blood-Feeding Mosquitoes. Annu Rev Entomol 58:433–453.

120. Hannon ER, Jackson KC, Biggerstaff BJ, Raman V, Komar N. 2019. Bloodmeal Host Selection of *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) in Las Vegas, Nevada, United States. J Med Entomol 56:603–608.

121. Foppa IM, Moore J, Caillouët KA, Wesson DM. 2011. Disproportionate mosquito feeding on aggregated hosts. J Med Entomol 48:1210–1213.

122. Barrera R, Amador M, Young G, Komar N. 2011. Mosquito (Diptera: Culicidae) bloodmeal sources during a period of west nile virus transmission in Puerto Rico. J Med Entomol 48:701–704.

123. Langevin SA, Bunning M, Davis B, Komar N. 2001. Experimental Infection of Chickens as Candidate Sentinels for West Nile Virus 7:726–729.

124. Zahid MH, Kribs CM. 2020. Decoys and Dilution : The Impact of Incompetent Hosts on Prevalence of Chagas Disease. Bull Math Biol 123:1–17.

125. Hess AD, Hayes RO. 1970. Relative potentials of domestic animals for zooprophylaxis against mosquito vectors of encephalitis. Am J Trop Med Hyg 19:327–334.

126. Alexander B, Carvalho RL De, Mccallum H, Pereira MH. 2002. Role of the Domestic Chicken (Gallus gallus) in the Epidemiology of Urban Visceral Leishmaniasis in Brazil 8.

127. Dahlin CR, Hughes DF, Meshaka WE, Coleman C, Henning JD. 2016. Wild snakes harbor West Nile virus. One Heal 2:136–138.

128. Lourenço-de-Oliveira R, Marques JT, Sreenu VB, Nten CA, Aguiar ERGR, Varjak M, Kohl A, Failloux AB. 2018. *Culex quinquefasciatus* mosquitoes do not support replication of Zika virus. J Gen Virol 99:258–264.

129. Guedes DRD, Paiva MHS, Donato MMA, Barbosa PP, Krokovsky L, Rocha SWS, Saraiva KLA, Crespo MM, Rezende TMT, Wallau GL, Barbosa RMR, Oliveira CMF, Melo-Santos MAV, Pena L, Cordeiro MT, Franca RFDO, De Oliveira ALS, Peixoto CA, Leal WS, Ayres CFJ. 2017. Zika virus replication in the mosquito *Culex quinquefasciatus* in Brazil. Emerg Microbes Infect 6.

130. Terzian ACB, Zini N, Sacchetto L, Rocha RF, Parra MCP, Del Sarto JL, Dias ACF, Coutinho F, Rayra J, da Silva RA, Costa VV, Fernandes NCCDA, Réssio R, Díaz-Delgado J, Guerra J, Cunha MS, Catão-Dias JL, Bittar C, Reis AFN, Santos INP dos, Ferreira ACM,

Cruz LEAA, Rahal P, Ullmann L, Malossi C, Araújo JP de, Widen S, de Rezende IM, Mello É, Pacca CC, Kroon EG, Trindade G, Drumond B, Chiaravalloti-Neto F, Vasilakis N, Teixeira MM, Nogueira ML. 2018. Evidence of natural Zika virus infection in neotropical non-human primates in Brazil. Sci Rep 8:1–15.

131. Ye Q, Liu ZY, Han JF, Jiang T, Li XF, Qin CF. 2016. Genomic characterization and phylogenetic analysis of Zika virus circulating in the Americas. Infect Genet Evol 43:43–49.

132. INCIENSA. 2016. Informe de vigilancia basada en laboratorio: Datos de biología molecular.

133. Yamilka D, Quiroz E, Carrera J, Cisneros J, Mosca IB De, Armi B, Chen R, Vasilakis N. 2019. Molecular Epidemiology of Dengue in Panama : 1–21.

134. Ramírez AL, Hurk AF Van Den, Meyer DB, Ritchie SA. 2018. Searching for the proverbial needle in a haystack : advances in mosquito-borne arbovirus surveillance 1–12.

135. Gu W, Novak RJ. 2004. Short report: Detection probability of arbovirus infection in mosquito populations. Am J Trop Med Hyg 71:636–638.

13. Anexos

Coordenadas de puntos de muestreo

Cuajiniquil		
Punto	Latitud	Longitud
CSCA	9°59'35.95"N	85°40'22.04"O
CSCB	10° 0'14.28"N	85°41'7.77"O
CSCC	9°59'45.12"N	85°41'58.87"O
CSCD	9°59'52.57"N	85°41'44.99"O
CSCE	10° 0'40.80"N	85°43'3.30"O
CSCF	10° 0'11.10"N	85°40'56.41"O
CSCG	10° 2'22.44"N	85°44'5.89"O
CSCH	10° 5'2.42"N	85°46'6.88"O
Talamanca		
Punto	**Latitud**	**Longitud**
CTAA	9°44'1.88"N	82°52'21.43"O
CTAB	9°41'58.77"N	82°54'21.03"O
CTAC	9°44'34.87"N	82°53'39.20"O
CTAD	9°34'12.86"N	82°43'30.70"O
CTAE	9°40'40.40"N	82°49'53.14"O
CTAF	9°33'58.61"N	82°55'23.06"O
CTAG	9°34'22.62"N	82°43'53.88"O
CTAH	9°43'52.98"N	82°50'25.81"O

Trámite de Ingreso Área de Conservación Tempisque

SISTEMA NACIONAL DE ÁREAS DE CONSERVACIÓN
AREA DE CONSERVACIÓN TEMPISQUE
DIRECCIÓN TÉCNICA
PROGRAMA DE INVESTIGACIÓN Y MONITOREO ECOLÓGICO

09 de agosto de 2017
ACT-PIM-070-17

Señor
Luis Mario Romero Vega
Investigador
Universidad de Costa Rica

ASUNTO: Trámite de permiso investigación

Estimado señor:

El pasado 07 de julio de 2017 me ingresó una solicitud suya para un permiso de investigación y colecta científica, procedente de la Secretaría Ejecutiva del SINAC.

En relación con el proyecto, el cual incluye acceso genético en su metodología, debo indicarle que su solicitud no es procedente.

Lo anterior en razón del marco normativo que rige su investigación: el Reglamento sobre el acceso a la biodiversidad en actividades de Docencia, Acción Social y de Investigación de la Universidad de Costa Rica, Resolución N° 5861-2005, publicado en el Alcance a La Gaceta N° 9-2005.

Por otra parte, debido a que los sitios de colecta identificados en el territorio del Área de Conservación Tempisque están fuera de nuestras áreas silvestres protegidas, tampoco procede un permiso de ingreso.

Cordialmente;

Lic. Roberto Zúñiga Muñoz
Coordinador, Investigación y Monitoreo Ecológico

RZM / rzm / Sustantivos / Investigación y Monitoreo / Coordinación*09.08.2017

C: Mauricio Méndez Venegas — Director Técnico ACT
Lourdes Vargas Fallas — Gestora PI-SINAC
Archivo de Gestión

Dirección: Hojancha, Guanacaste, diagonal esquina sureste Iglesia Católica
www.actempisque.org
TELEFAX (506)2659 81 90, 2659 81 93, 2659 93 69

COSTA RICA

Trámite de Ingreso Área de Conservación La Amistad-Caribe

SISTEMA NACIONAL DE ÁREAS DE CONSERVACIÓN
ÁREA DE CONSERVACIÓN LA AMISTAD CARIBE
PROGRAMA DE INVESTIGACIÓN

RESOLUCIÓN N°
R-SINAC-PNI-ACLAC-054-2018
Exp. Dig. N° M-PC-SINAC-PNI-ACLAC-047-2018

Ministerio Del Ambiente y Energía, Sistema Nacional de Áreas de Conservación, a través del Programa de Investigación del Área de Conservación La Amistad Caribe, a las nueve horas, treinta minutos del día 25 del mes de julio del año dos mil dieciocho.

RESULTANDO

PRIMERO: Que el día segundo del mes de julio del año dos mil dieciocho, se recibe vía electrónica solicitud de permiso de investigación y licencia de colecta científica de Luis Mario Romero Vega, costarricense, veterinario documento de identidad N° 1-1429-0716, dirección permanente: Dulce Nombre de Coronado. San José, Costa Rica, solicita permiso para desarrollar el proyecto: "Dinámica de las arbovirosis en Costa Rica: "Estudio de vectores (*Aedes aegypti*, Culex sp., etc.), reservorios (aves y mamíferos), aspectos virológicos y seroepidemiología de Zika, Chikungunya y otros arbovirus en dos localidades endémicas a Dengue, Encefalitis Equina Venezolana y Virus del Oeste del Nilo" (tesis de posgrado).

SEGUNDO: Que la investigación es apoyada por el Centro de Investigación en Enfermedades Tropicales (CIET), Universidad de Costa Rica - UCR (CIET-0316-2018). Tel. (506) 2511-8602, Fax. (506) 2225-4384. Web: http://ciet.ucr.ac.cr. Correo-e: ciet.fm@ucr.ac.cr.

TERCERO: Que se solicita autorizar la participación en esta investigación científica a Daniel Barrantes Murillo, costarricense, veterinario documento de identidad N° 2-0700-0565, María Martha Piche Ovares, costarricense, veterinaria documento de identidad N° 4-0197-0905, Eugenia Corrales Aguilar, costarricense, microbióloga documento de identidad N° 1-0995-0701 y Claudio Enrique Soto Garita, costarricense, microbiólogo documento de identidad N° 1-1480-0927, en calidad de calidad de coinvestigadores.

CUARTO: Que el día décimo segundo de mes de julio del año dos mil dieciocho, vía electrónica el solicitante cumplió con todos los requisitos establecidos en el Decreto Nº32553-MINAE.

CONSIDERANDO

PRIMERO: Que la Ley de Conservación de la Vida Silvestre No.7317, del treinta de octubre de mil novecientos noventa y dos y sus reformas, en los artículos 1 y 3, establece que: "La vida silvestre está conformada por el conjunto de organismos que viven en condiciones naturales, temporales o permanentes en el territorio nacional,..." que "Se declara de dominio público la fauna silvestre que constituye un recurso natural renovable,.... De interés público la flora silvestre..." y que únicamente pueden ser objeto de apropiación particular y de comercio mediante las disposiciones contenidas en los tratados públicos, en los convenios

internacionales y en la presente Ley Nº 7317 y su reglamento, artículos 3 y del 36 al 50 y otras normativas vinculantes.

SEGUNDO: Que según la ley Nº 7317, Ley de Conservación de la Vida Silvestre y sus reformas, en el artículo 6 o, establece que el Sistema Nacional de Áreas de Conservación del Ministerio de Ambiente y Energía es el órgano competente en materia de planificación, desarrollo y control de la vida silvestre, en igual sentido dicha competencia se encuentra establecida en el artículo 22 de la ley de Biodiversidad Nº 7788.

TERCERO: Que según la ley Nº 7317, Ley de Conservación de la Vida Silvestre y sus reformas, en el artículo 7o, inciso e) establece que el Sistema Nacional de Áreas de Conservación del Ministerio de Ambiente y Energía tiene entre sus competencias el promover y ejecutar investigaciones en el campo de la Vida Silvestre.

CUARTO: Que según la ley Nº 7317, Ley de Conservación de la Vida Silvestre y sus reformas, en el artículo 40 al 49, faculta al SINAC dar autorización para permisos de investigación, así como rechazar cualquier solicitud contraria al interés público y fiscalizar la ejecución de estas actividades.

QUINTO: Que según la ley No 4594, Duplicado Material Zoológico Botánico o Mineral a UCR y Museo Nacional del primero de julio del año mil novecientos setenta, en su artículo 1o indica que: "Artículo 1°.- Todo científico o institución que personalmente o en representación, recoja material botánico, zoológico o mineral con fines taxonómicos, en cualquier zona o lugar del territorio nacional, tiene la obligación de dejar duplicados de sus colecciones a la Universidad de Costa Rica y al Museo Nacional. La Universidad de Costa Rica y el Museo Nacional, conjuntamente, pueden exonerar al científico o institución de que se trata, de la obligación a que se refiere el párrafo anterior, tomando en consideración motivos calificados que el impidan dejar esos duplicados."

SEXTO: Que la Ley Forestal número siete mil quinientos setenta y cinco (Ley N° 7575, publicada en La Gaceta N° 72 del 16 de abril de 1996) y sus reformas, artículo dieciocho, determina la facultad del Estado para realizar o autorizar labores de investigación en el patrimonio natural del Estado.

SÉPTIMO: Que la Ley de Biodiversidad (Ley Nº 7788) en su Artículo 89: Fomento de programas de investigación, divulgación e información; establece que el Ministerio del Ambiente y Energía y las demás instituciones públicas y privadas fomentarán el desarrollo de programas de investigación sobre la diversidad biológica.

OCTAVO: Que la Ley de Conservación de la Vida Silvestre (Ley N°7317), en su Artículo 2, define como Estudio Científico: Toda investigación que aplica el método científico; colectar: acción de recoger, cortar, capturar o separar de su medio especies orgánicas, sus productos o subproductos; Colecta Científica: la captura o extracción de animales o plantas, sus productos o subproductos, con fines de estudio científico.

NOVENO: Que la Estrategia Nacional de Conservación y Uso Sostenible de la Biodiversidad, establece dentro de sus políticas: el impulso a las investigaciones dirigidas a conocer el estado de las especies y ecosistemas de interés particular para la conservación.

DÉCIMO: Que las Políticas para las Áreas Silvestres Protegidas establecen que se debe: - fomentar el desarrollo de la investigación básica y aplicada dentro de las áreas silvestres protegidas, de acuerdo con las necesidades identificadas por la institución; - autorizar aquellas investigaciones que se realicen en las áreas silvestres protegidas de conformidad con lo que establece la legislación vigente, la reglamentación interna del Área de Conservación y las prioridades de investigación identificadas por las áreas silvestres protegidas. Políticas que priorizan como actividad el que: cada Área de Conservación deberá fomentar, emitir lineamientos, participar y colaborar en el desarrollo de investigaciones básicas e inventarios de biodiversidad con las instituciones interesadas en este campo; para lograr lo antes posible un mejor entendimiento de la biodiversidad presente en las ASP y en los bosques patrimonio del Estado tanto en áreas estatales como privadas.

DECIMO PRIMERO: Que las Áreas de Conservación tienen un Coordinador de Investigación que tiene como objetivo, promover, coordinar y facilitar procesos de investigación y monitoreo de manera que la información generada y sistematizada oriente la toma de decisiones para la conservación, manejo y uso sostenible de los recursos naturales y culturales presentes en el Área de Conservación.

DECIMO SEGUNDO: Que en el Manual de Procedimientos para realizar Investigación en Biodiversidad y Recursos Culturales en las Áreas de Conservación, establecido por el Comité Técnico de Investigación del SINAC (decreto ejecutivo N°28993-MINAE) y oficializado por el SINAC (oficios SINAC-DG-147 y DG-149, del 2002 y por el decreto ejecutivo N°32553-MINAE) se establece como función de los encargados de los Programas de Investigación, entre otras, las siguientes: a) Tramitar, evaluar y resolver los proyectos de investigación que se presenten ante su oficina regional, para realizar estudios científicos en su área de conservación. b) Elaborar las resoluciones respectivas y otorgar el pasaporte científico (licencia de recolecta científica). c) Recibir y analizar toda solicitud de permiso de investigación que se presente ante su oficina regional, para realizar estudios científicos en su área de conservación. d) Establecer acuerdos de Transferencia de Material cuando sea considerado necesario por la naturaleza de la investigación

DÉCIMO TERCERO: Que de conformidad con el criterio de la Secretaría Técnica Nacional Ambiental (SETENA), según acuerdo ACP-70-2015, del 23 de junio de 2015, de la Sesión Ordinaria 088-2015-SETENA de su Comisión Plenaria, la evaluación de impacto ambiental no resulta de aplicación para los permisos de investigación ni las licencias de colecta científica o académica, a que se refiere el numeral 26 de la Ley de Conservación de la Vida Silvestre 7317.

DECIMO CUARTO: Que los objetivos de la investigación concuerdan con los objetivos de conservación del SINAC-MINAE, detallados en su Plan Estratégico respectivo cuando procede; así como en los objetivos de investigación que se enmarcan en la Estrategia Nacional de Investigación.

DÉCIMO QUINTO: Que las personas físicas o jurídicas que acrediten personal de apoyo al proceso de investigación deberán especificar la condición de dicho personal (asistentes). En caso de manejo de vida silvestre únicamente lo podrá realizar las personas que sean acreditadas por el investigador como asistentes de la investigación y que se encuentren facultadas para tal manejo según los fines y métodos de la investigación. Se aclara que en el caso de colaboradores que participen del proyecto de investigación en forma ad honorem (como voluntarios), por tratarse de una relación entre particulares, esta no se encuentra regulada por la normativa del Decreto de voluntariado del SINAC vigente, Decreto Ejecutivo N° 36812.

Por tanto,

El Programa de Investigación del Área de Conservación La Amistad – Caribe

RESUELVE:

PRIMERO: Aprobar la solicitud presentada por Luis Mario Romero Vega, documento de identidad N° 1-1429-0716, para desarrollar la investigación científica "Dinámica de las arbovirosis en Costa Rica: Estudio de vectores (*Aedes aegypti*, Culex sp., etc.), reservorios (aves y mamíferos), aspectos virológicos y seroepidemiología de Zika, Chikungunya y otros arbovirus en dos localidades endémicas a Dengue, Encefalitis Equina Venezolana y Virus del Oeste del Nilo", con el objetivo principal de: - Analizar la dinámica de las arbovirosis en Costa Rica mediante el estudio de vectores, posibles reservorios (aves y mamíferos), aspectos virológicos y seroepidemiología del virus Zika, Chikungunya y otras arbovirosis en dos áreas endémicas para mejorar la comprensión y profilaxis de estas infecciones en humanos y animales domésticos. Los objetivos específicos de: - Complementar el cuadro epidemiológico de Alfa y Flavivirus en dos localidades de Costa Rica para mejorar el conocimiento de las arbovirosis en nuestro medio. - Brindar apoyo al sector salud y veterinario para el diagnóstico de las arbovirosis causadas por Flavivirus y Alfavirus. - Realizar análisis filogenético Bayesiano de

las secuencias virales obtenidas en el estudio para determinar la diversidad de los virus circulantes.

SEGUNDO: Autorizar la participación en esta investigación científica a Luis Mario Romero Vega, documento de identidad N° 1-1429-0716, como investigador principal. A Daniel Barrantes Murillo, documento de identidad N° 2-0700-0565, María Martha Piche Ovares, documento de identidad N° 4-0197-0905, Eugenia Corrales Aguilar, documento de identidad N° 1-0995-0701 y Claudio Enrique Soto Garita, documento de identidad N° 1-1480-0927, como coinvestigadores.

TERCERO: Otorgar licencias de colecta científica N° ACLAC-262-2018 a Luis Mario Romero Vega, N° ACLAC-263-2018 a Daniel Barrantes Murillo, N° ACLAC-264-2018 a María Martha Piche Ovares, N° ACLAC-265-2018 a Eugenia Corrales Aguilar y N° ACLAC-266-2018 a Claudio Enrique Soto Garita, para la **Colecta permanente** de:

Cantidad a colectar/localidad	Material a colectar	Grupo Taxonómico
25 individuos	roedores	Clase: Mammalia – Orden: Rodentia
10 individuos	aves	Clase: Aves – Orden: Passeriformes :No Passeriformes
1000 o más individuos	mosquitos	Clase: Insecta: Orden: Diptera

- Toma de variables biométricas y fotografías.
- **Manipulación temporal** del hábitat para la colocación de las *trampas Sherman* para roedores y para la colocación y manipulación de las *redes de niebla* para la avifauna.

- No se permite la ***colecta permanente*** de los individuos de las especies de roedores y aves que se capturen y se encuentran en los listados de **ESPECIES EN PELIGRO DE EXTINCIÓN**, con **POBLACIONES REDUCIDAS** y en los listados de **CITES** para Costa Rica, según la Resolución: ***R-SINAC-CONAC-092-2017***.

CUARTO: **Descripción del lugar de acceso**. Que el área específica donde se llevará a cabo la investigación corresponde a fincas privadas siguientes:

1 - Don Paco Chavarría - Julio Chavarria, Hone Creek Sur: 9°44'1.62"N - 82°52'23.67"O
2 - José Antonio Bolívar, Hone Creek Norte: 9°44'32.28"N - 82°53'37.53"O
3 – Deyogen, Hone Creek Norte: 9°41'59.18"N - 82°54'19.85"O

4 - Joseph a.k.a Big Joe – Dra. Grace, Cahuita: 9°43'52.73"N - 82°50'26.41"O

Las fincas se localizan dentro del cantón de Talamanca, provincia de Limón, Área de Conservación La Amistad Caribe.

QUINTO: El Sistema Nacional de Áreas de Conservación únicamente autorizará los métodos de recolecta científica enumerados en el reglamento # 32633 de la Ley de Conservación de la Vida Silvestre N° 7317 y sus reformas.

SEXTO: **De la metodología científica.** - Captura y Muestreo roedores: Se colectarán un máximo de 25 roedores. En los sitios de muestreo se colocarán 70 trampas Sherman (Woodman, 1997) con 10 metros de distancia de una a la otra, formando una escuadra 100x70 metros cuadrados. Las trampas serán cebadas con una mezcla de mantequilla de maní, avena y esencia de vainilla. Serán colocadas entre las 14:00 y 17:00 horas y revisadas a la mañana siguiente. Estas serán colocadas un mínimo de 2 noches seguidas. Los roedores capturados serán recolectados permanentemente. La eutanasia será realizada introduciendo la trampa Sherman en una bolsa Ziploc, la cual contiene un algodón impregnado de Isoflurano. Se dejará al animal en un lugar calmado y a la sombra durante diez minutos, al cabo de este tiempo se evaluaron los signos vitales (palpación de ritmo cardiaco y reflejo corneal). Si al cabo de este tiempo el animal aún presenta algún signo vital, se procederá a la dislocación cervical. Una vez eutanasiados se procederá a obtener una muestra de sangre vía intracardiaca. Posteriormente se tomarán fotos y medidas del cuerpo, cola, oreja y tarsos para su identificación (Reid, 2009). La necropsia será realizada de acuerdo al protocolo descrito por Elvang, 2011. Los órganos (Pulmón, hígado, riñón, bazo, cerebro) se preservarán tanto en formalina al 10% como en ARN later para la preservación de material genético. - Captura y Muestreo de Aves: En los mismos sitios de captura de roedores se colocarán 10 redes de niebla para la captura de aves de acuerdo con lo recomendado por varios autores (NABC, 2001; Gosler, 2004). En caso de lluvia intensa, las redes serán cerradas hasta que la lluvia cese para ser reabiertas nuevamente. Las redes estarán abiertas desde las 15:00 horas hasta las 17:00 horas. Las aves capturadas serán clasificadas por especie y posteriormente se les tomará una muestra sanguínea. Al menos diez aves por sitio serán capturadas permanentemente. El procedimiento de eutanasia se realizará igual que el de roedores. Posteriormente se les realizará necropsia y se tomaran muestras de órganos (Pulmón, hígado, riñón, bazo, cerebro) los cuales se preservaran tanto en formalina al 10% como en RNA later para la preservación de material genético. - Colectar e identificar vectores (mosquitos): Se colocarán trampas para mosquitos en la misma zona de captura. Las trampas utilizadas serán las trampas tipo "CDC" de CO_2 y luz, así como trampas para hembras grávidas. Estas serán colocadas en áreas boscosas, en los dormideros de los animales domésticos y en las casas de habitación presentes en las áreas de estudio. Estarán activadas durante todo el día y la noche, por un total de dos días seguidos. Las trampas serán revisadas y recargadas con hielo seco como fuente de CO_2 cada 9-12 horas y los mosquitos recolectados

serán almacenados en frío para su traslado e identificación en el Laboratorio de Entomología Médica de la UCR. Una vez identificados, se almacenarán en RNA Later para la posterior extracción de ácidos nucleicos, utilizando Trizol ®. Todo el material genético será depositado en el Laboratorio de Virología y en el Laboratorio de Entomología Médica de la Facultad de Microbiología de la Universidad de Costa Rica.

SEPTIMO: Para la inscripción de personas adicionales en la investigación y/o el otorgamiento de pasaportes de colecta científica adicionales a coinvestigadores y asistentes de investigación, se deben presentar en físico o mediante medio electrónico de acuerdo a la legislación vigente, los requisitos siguientes: Una fotografía reciente tamaño pasaporte (4,5cmx3,5cm) de frente que cubra toda la cara hasta los hombros, sin lentes oscuros, sombrero, gorra u otro accesorio, hoja de Vida en idioma español para cada uno de los asistentes, copia de la cédula de identidad o pasaporte de cada uno de los asistentes, una carta de solicitud de inclusión de los asistentes dentro de la investigación.

OCTAVO: El presente permiso no autoriza la comercialización de plantas o animales ni subproductos de éstos.

NOVENO: Cuando los especímenes obtenidos mediante colecta científica o cultural se destinen a instituciones extranjeras, el Sistema Nacional de Áreas de Conservación, exigirá, antes de otorgar el permiso de exportación con fines científicos o culturales, la entrega de ejemplares idénticos para el Museo Nacional y a la Universidad de Costa Rica, para los jardines botánicos y los zoológicos estatales, única y exclusivamente. (Artículo 46 Ley No 7317). Así, también se exigirá la devolución de los especímenes colectados (vivos o muertos) al Museo de Zoología de la UCR.

DÉCIMO: Este permiso no faculta para colectar en finca particulares o en Territorio Indígena sin el respectivo permiso de quien está legalmente autorizado para otorgarlo. La eficacia de este permiso queda sujeta a la existencia de una autorización adicional por parte del propietario de dichos terrenos privados o de quien estuviera legalmente facultado para ello.

DÉCIMO PRIMERO: El Área de Conservación La Amistad Caribe se reserva el derecho de cancelar este permiso sin responsabilidad alguna para el Estado, cuando se compruebe que se ha incumplido el mismo.

DÉCIMO SEGUNDO: El permisionario no puede ceder ni en modo alguno enajenar este permiso, pues el mismo es personal e intransferible. Del mismo modo, cuando el investigador principal o alguno de sus coinvestigadores desee incluir nuevos asistentes de investigación no autorizados en el **resuelve SEGUNDO** de este permiso, deberá solicitarlo por escrito al Programa de Investigación del Área de Conservación La Amistad Caribe con al menos 8 días

Dirección: Reserva Biológica Hitoy Cerere, Valle La Estrella.
Tel. (506) 22065516 • Fax: (506) 22065516• Apdo.: 1077-7300.

Limón-Costa Rica

de antelación. No se autoriza el uso de este permiso y sus respectivas licencias de colecta para otros fines ajenos a las labores científicas del presente proyecto, debiendo forzosamente solicitarse otros permisos y licencias adicionales para la realización de giras de campo, prácticas supervisadas, tesis de grado o posgrado y otras actividades similares que formen parte de los programas de estudios universitarios.

DÉCIMO TERCERO: El permisionario deberá permitir a los funcionarios (as) del Sistema Nacional de Áreas de Conservación, el ingreso al lugar donde se realizará el acceso o al lugar donde se realiza la investigación.

DÉCIMO CUARTO: El Sistema Nacional de Áreas de Conservación salva la responsabilidad sobre cualquier accidente o situación que afecte y/o ponga en peligro la integridad de las personas (investigadores, asistentes de campo) que participan en el desarrollo de las actividades de la investigación.

DÉCIMO QUINTO: **Del Informe Final**. El investigador principal deberá rendir ante el Área de Conservación La Amistad Caribe - ACLAC un informe escrito/digital (en formato del SINAC) antes del **25 de octubre del 2019**, en idioma español, en cumplimiento de lo establecido por el artículo 38 de la Ley de Conservación de la Vida Silvestre N° 7317 y su Reglamento decreto Ejecutivo N° 32633-MINAE. El incumplimiento de este requisito será sancionado (a) con la imposibilidad, para los (as) científicos (as) en forma personal o para la institución que representa, de obtener nuevas autorizaciones, de estudios o investigaciones, hasta por un período de cinco años.

DÉCIMO SÉXTO: El permisionario deberá acatar las recomendaciones técnicas dadas por el Sistema Nacional de Áreas de Conservación y se compromete a enviar copia a la Biblioteca Nacional y al Área de Conservación las publicaciones que genere el presente permiso de investigación.

DECIMO SÉPTIMO: **De la Vigencia**. Este permiso rige a partir del **26 de julio del 2018** y hasta el día **25 de julio del 2019**, pudiendo solicitarse un nuevo permiso para el mismo proyecto, desde treinta días antes de su vencimiento.

DÉCIMO OCTAVO: De comprobarse el incumplimiento parcial o total de algunas de las cláusulas citadas en la presente resolución o a la Ley de Vida Silvestre número 7317 y su reglamento, se cancelaría el permiso, con las consecuencias administrativas, civiles y penales, que consecuentemente se deriven y se interpondrá sin mayor demora la denuncia penal o administrativa ante la autoridad correspondiente.

Dirección: Reserva Biológica Hitoy Cerere, Valle La Estrella.
Tel. (506) 22065516 • Fax: (506) 22065516• Apdo.: 1077-7300.

Limón-Costa Rica

DÉCIMO NOVENO: Contra la presente resolución proceden los recursos ordinarios de revocatoria y / o apelación, de conformidad con los artículos 343 y siguientes de la Ley General de la Administración Pública, los cuales serán resueltos, el de revocatoria por el mismo órgano que lo dictó y el de apelación por el Consejo Nacional de Áreas de Conservación. Los recursos deberán interponerse ante el órgano que dicta esta resolución dentro de los tres días tratándose de acto final y de veinticuatro horas en los demás casos, contados, en ambos casos, posteriores a su notificación.

VIGÉSIMO: Notifíquese contra la presente.

JORGE ARTURO GONZALEZ VILLALOBOS (FIRMA)

Firmado digitalmente por JORGE ARTURO GONZALEZ VILLALOBOS (FIRMA)
Fecha: 2018.07.25 21:48:15 -06'00'

Jorge González Villalobos
Programa de Investigación
ACLAC-SINAC-MINAE

C: Donald Campbell, Jefe Subregión Limón-Talamanca-ACLAC-SINAC-MINAE
José Masis, Jefe Unidad Protección-Control-ACLAC-SINAC-MINAE
Gina Cuza, Directora de Áreas Silvestres Protegidas-ACLAC-SINAC-MINAE
Archivo Programa de Investigación-ACLAC-SINAC-MINAE

NOTIFICADO VIA CORREO ELECTRÓNICO

Este documento está firmado digitalmente, por lo que corresponde al documento original en su archivo electrónico, por favor portarlo en algún dispositivo de almacenamiento con el fin de mostrarlo a las autoridades cuando lo soliciten

Resolución de la Comisión Institucional de Biodiversidad

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA

VI Vicerrectoría de Investigación

72

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA
FACULTAD DE MICROBIOLOGÍA
19 MAY 2017
RECIBIDO
Por: Hora:

16 de mayo de 2017
VI-2994-2017

Dra. Eugenia Corrales Aguilar
Investigadora
CIET

Estimada señora:

De conformidad con lo dispuesto en el "Reglamento sobre el Acceso a la Biodiversidad en Actividades de Docencia, Acción Social y de Investigación en la Universidad de Costa Rica", la Comisión Institucional de Biodiversidad revisó el proyecto **"Dinámica de las arbovirosis en Costa Rica: Estudio de vectores, reservorios, aspectos virológicos y seroepidemiológicos de Zika, Dengue, Chikungunya y otras arbovirosis en una localidad endémica, Plan Piloto de la Universidad de Costa Rica (UCR)",** el cual se encuentra bajo su coordinación.

Le comunico que la Comisión Institucional de Biodiversidad aprobó el permiso de acceso a los elementos de la biodiversidad que se indican en su proyecto de investigación. Por esta razón le envío la Resolución **#096** de la Comisión mediante la cual se le comunican las condiciones con que se aprueba este permiso de acceso.

Le saluda con toda consideración,

M.Sc. Jorge Warner
Coordinador
Comisión Institucional de Biodiversidad

JW/lf
C. Dario Hernández Castro, Gestor, VI
Consejo Científico del CIET
Licda. Silvia Salazar F., PROINNOVA
Archivo/Comisión de Biodiversidad

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA

VI Vicerrectoría de Investigación

RESOLUCIÓN No. 096

La Comisión Institucional de Biodiversidad de la Universidad de Costa Rica, conoce la solicitud de permiso de acceso a los elementos y recursos genéticos y bioquímicos de la biodiversidad.

RESULTANDO

Primero: Que se presentó para su revisión por parte de la Comisión Institucional de Biodiversidad el Proyecto denominado "**Dinámica de las arbovirosis en Costa Rica: Estudio de vectores, reservorios, aspectos virológicos y seroepidemiológicos de Zika, Dengue, Chikungunya y otras arbovirosis en una localidad endémica, Plan Piloto de la Universidad de Costa Rica (UCR)",** propuesto por la Dra. Eugenia Corrales Aguilar, Investigadora del Centro de Investigación en Enfermedades Tropicales (CIET). El proyecto tiene como objetivo general analizar la dinámica de las arbovirosis en Costa Rica mediante el estudio de vectores, posibles reservorios (aves y mamíferos), aspectos virológicos y seroepidemiología del virus Zika, Chikungunya y otras arbovirosis en un área endémica para mejorar la comprensión y profilaxis de estas infecciones en humanos y animales domésticos.

Segundo: Que la Comisión decidió revisar este proyecto de investigación básica por cuanto se encuentra contemplado en las actividades enumeradas en el Reglamento de Acceso a los Elementos de la Biodiversidad en actividades de Docencia, Acción Social y de Investigación de la Universidad de Costa Rica de conformidad con los artículos 10, 22 a 27 del citado reglamento.

Tercero: Que de la evaluación de la documentación se concluye que el proyecto tiene acceso al material genético, y que lo utilizará solamente con fines de investigación básica.

Cuarto: Que para el análisis de este Proyecto y la emisión de la correspondiente Resolución se han tomado en consideración los Principios Generales, Objetivos y Criterios Aplicables contemplados en el Reglamento así como el marco legal internacional aplicable.

Quinto: Que el Reglamento de Acceso a los Elementos de la Biodiversidad en actividades de Docencia, Acción Social y de Investigación de la Universidad de Costa Rica otorga a la Comisión Institucional de Biodiversidad las competencias para hacer operativo el Reglamento y, entre otras atribuciones, la de aprobar los proyectos de investigación, docencia y acción social en los que haya acceso a los elementos de la biodiversidad.

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA

VI Vicerrectoría de Investigación

POR TANTO,

LA COMISIÓN INSTITUCIONAL DE BIODIVERSIDAD
RESUELVE:

PRIMERO: Aprobar el acceso a los elementos y recursos genéticos y bioquímicos de la biodiversidad que se indican en la propuesta para el desarrollo de la investigación básica denominada "**Dinámica de las arbovirosis en Costa Rica: Estudio de vectores, reservorios, aspectos virológicos y seroepidemiológicos de Zika, Dengue, Chikungunya y otras arbovirosis en una localidad endémica, Plan Piloto de la Universidad de Costa Rica (UCR)",** propuesto por la Dra. Eugenia Corrales Aguilar, Investigadora del Centro de Investigación en Enfermedades Tropicales (CIET).

SEGUNDO: En caso de que el proyecto de investigación cambie por el efecto dinámico de la investigación y se ubique en las categorías de investigación aplicada, bioprospección o comercialización, la investigadora deberá comunicarlo por escrito a la Comisión para que esta proceda a determinar lo que corresponda, incluyendo la necesidad de emitir una nueva Resolución de conformidad con el tipo de proyecto.

TERCERO: Este permiso lo es únicamente para el acceso a los recursos genéticos y bioquímicos. La investigadora deberá solicitar por su cuenta, los permisos de recolecta y autorización para el ingreso a los sitios donde se realicen las recolectas o se materialice el acceso, los cuales deberán ser tramitados ante las instancias correspondientes del Sistema Nacional de Áreas de Conservación. Este permiso solo autoriza el acceso a los recursos genéticos y bioquímicos de conformidad con los términos del proyecto aprobado. La obtención de cualquier otro permiso para la realización del proyecto (CITES, certificado fitosanitario de exportación o de importación, etc.) es responsabilidad de la investigadora.

CUARTO: El material biológico que se requiera para referencia deberá depositarse en una colección institucional de la Universidad de Costa Rica.

QUINTO: Cualquier transferencia de material de origen biológico fuera de la Universidad de Costa Rica debe realizarse mediante un Acuerdo de Transferencia de Material (ATM) entre la institución receptora y la Universidad de Costa Rica. Los términos de este ATM se deben negociar con la participación de PROINNOVA y de la Comisión Institucional de Biodiversidad. Estos términos deben incluir lo relativo a la distribución de posibles beneficios que surjan de la investigación y el acceso al material.

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA

VI Vicerrectoría de Investigación

SEXTO: La investigadora responsable del proyecto comunicará a la Comisión cualquier cambio en el proyecto que implique una modificación sustancial de las actividades con base en las cuales se otorgó el presente permiso.

SÉTIMO: De conformidad con el cronograma del proyecto aprobado, el presente permiso de acceso se otorga hasta el 31 de diciembre de 2017. Al finalizar el proyecto, la investigadora responsable deberá enviar a esta Comisión un informe del acceso que realizó a los recursos genéticos y bioquímicos de la biodiversidad. Este informe debe incluir lo siguiente:

-Nombre científico y cantidad de muestras recolectadas
-Fecha en que se recolectaron las muestras
-Nombre de recolector o recolectora
-Número del permiso de recolecta otorgado por el SINAC con el cual fueron recolectadas las muestras.
-Nombre de la colección donde se depositaron las muestras.
-Información detallada de cualquier transferencia de material biológico realizada a otra institución.
-Breve resumen de los principales resultados científicos obtenidos a partir del estudio de las muestras recolectas.

OCTAVO: La Comisión se reserva el derecho de cancelar este permiso en el caso de que se incumpla con lo establecido en esta Resolución o con la normativa legal vigente. Contra esta Resolución tienen lugar los recursos ordinarios de revocatoria ante la Comisión y la apelación ante la persona que ocupe la Rectoría, dentro de los siete días hábiles siguientes a la notificación de la presente Resolución.

Ciudad Universitaria, "Rodrigo Facio", 16 de mayo de 2017
COMUNÍQUESE

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA | VICERRECTORÍA DE INVESTIGACIÓN

M.Sc. Jorge Warner
Coordinador
Comisión Institucional de Biodiversidad

JWP/LFC

Otras publicaciones asociadas a mosquitos en Costa Rica y enfermedades vectoriales.

Journal of Medical Entomology, 56(2), 2019, 491–500
doi: 10.1093/jme/tjy170
Advance Access Publication Date: 3 October 2018
Research Article

OXFORD

Sampling, Distribution, Dispersal

Mosquito (Diptera: Culicidae) Species Composition in Ovitraps From a Mesoamerican Tropical Montane Cloud Forest

Luis Mario Romero,[1] Luis Guillermo Chaverri,[2] and Luis Fernando Chaves[3,4,5,]

[1]Centro de Investigación en Enfermedades Tropicales, Universidad de Costa Rica, San Pedro de Montes de Oca, San José, Costa Rica, [2]Departamento de Ciencias Naturales, Escuela de Enseñanza de las Ciencias, Universidad Estadal a Distancia, San Pedro de Montes de Oca, San José, Costa Rica, [3]Instituto Costarricense de Investigación y Enseñanza en Nutrición y Salud (INCIENSA), Apartado Postal 4-2250, Tres Ríos, Cartago, Costa Rica, [4]Programa de Investigación en Enfermedades Tropicales (PIET), Escuela de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional, Heredia, Costa Rica, and [5]Corresponding author, e-mail: lfchavs@gmail.com

Subject Editor: Jonathan Day

Received 3 June 2018; Editorial decision 20 August 2018

Abstract

Knowledge about mosquito species diversity at tropical montane cloud forests (TMCFs) in Mesoamerica is scarce. Here, we present data on mosquito species richness from samples biweekly collected, from January to December 2017, in ovitraps installed in a TMCF patch at Vázquez de Coronado County, Costa Rica. Ovitraps were placed at 2.25, 1.50 and 0.75 m at 16 sampling points. During the study period we measured relative humidity and air temperature at each sampling point, and water temperature, volume and pH in each ovitrap. We collected a total of 431 mosquito larvae belonging to five taxonomic units, one identified to the genus level and four to the species level. The most common mosquito species was *Culex bihaicolus* Dyar & Nuñez Tovar (Diptera: Culicidae), which accounted for nearly 80% (n = 344) of the collected mosquitoes. *Culex nigripalpus* Theobald (Diptera: Culicidae) was the only medically important species we found and it was collected both in the dry (January to March) and rainy season (April to December). Over 95% (n = 411) of the mosquitoes were collected during the rainy season and 60% (n = 257) at 0.75 m. Among the environmental variables that we measured, only water volume and pH were significantly (P < 0.05) different between the dry and rainy season, the former increasing and the later decreasing during the rainy season. These results suggest that rainfall plays a major role regulating the phenology of the sampled mosquito species and highlight the need to screen for pathogens in *Cx. nigripalpus* at the study area.

Key words: Culicidae, Costa Rica, container mosquito, longitudinal data

Mosquito diversity surveys are important for disease control because they reveal the entomological risk posed by the presence of dominant vector species, i.e., those species competent and able to efficiently transmit pathogens that affect human health (Turell et al. 2001, Turell et al. 2005). Furthermore, when mosquito diversity surveys are longitudinal they also allow to describe the phenology of mosquito species with and without medical importance (Toma and Miyagi 1981, Reisen et al. 1999, Hoshi et al. 2014b), and to evaluate associations between mosquito diversity and infection (Chaves et al. 2011).

From an ecological perspective, understanding mosquito diversity is necessary to generalize principles about insect diversity and factors shaping it (Foley et al. 2007), and to also generate landmark observations that could be useful to evaluate impacts of climate change on medically important taxa (Chaves 2016, Chaves and Añez 2016, Chaves 2017a). For example, Costa Rica is a global biodiversity hotspot (Mittermeier et al. 1998, Myers et al. 2000), and this pattern of overwhelming diversity also extends to mosquitoes (Foley et al. 2007). In Costa Rica, longitudinal studies on mosquito species diversity have been unusual, and most data comes from short-term surveys (Heinemann and Belkin 1977, Burkett-Cadena et al. 2013, Chaverri et al. 2018). Despite its small geographical area Costa Rica has a great richness of natural ecosystems which in part explains its huge diversity of living taxa (Kappelle 2016), but some highland ecosystems have been poorly studied, e.g., tropical montane cloud forests (Myers et al. 2000), hereafter referred as TMCFs.

In general, mosquito diversity studies in Costa Rica have been biased toward the lowlands (Heinemann and Belkin 1977, Gilbert et al. 2008, Burkett-Cadena et al. 2013, Chaverri et al. 2018), an area that historically has faced epidemics of mosquito-borne diseases, including arboviruses, such as dengue (Calderón-Arguedas et al. 2015, Soto-Garita et al. 2016) and Yellow fever (Romero and

© The Author(s) 2018. Published by Oxford University Press on behalf of Entomological Society of America. All rights reserved.
For permissions, please e-mail: journals.permissions@oup.com.

Downloaded from https://academic.oup.com/jme/article/56/2/491/5114623 by ESA Member Access user on 05 January 2021

Journal of Medical Entomology, 55(3), 2018, 646–653
doi: 10.1093/jme/tjx254
Advance Access Publication Date: 30 January 2018
Research Article

Mosquito Species (Diptera: Culicidae) Diversity from Ovitraps in a Mesoamerican Tropical Rainforest

Luis Guillermo Chaverri,[1] Claire Dillenbeck,[2] Devon Lewis,[3] Cindy Rivera,[4] Luis Mario Romero,[5] and Luis Fernando Chaves[6,7]

[1]Departamento de Ciencias Naturales, Escuela de Enseñanza de las Ciencias, Universidad Estadal a Distancia, San Pedro de Montes de Oca, San José, Costa Rica, [2]Department of Biology, Emory University, Atlanta, GA 30322, USA, [3]Department of Biology, Duke University, Durham, NC 27708, USA, [4]Neuroscience Program, Bowdoin College, Brunswick, ME 04011, USA, [5]Centro de Investigación en Enfermedades Tropicales, Universidad de Costa Rica, San Pedro de Montes de Oca, San José, Costa Rica, [6]Programa de Investigación en Enfermedades Tropicales (PIET), Escuela de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional, Apartado Postal 304-3000 Heredia, Costa Rica, and [7]Corresponding author, e-mail: lfchavs@gmail.com

Subject Editor: Scott Ritchie

Received 6 September 2017; Editorial decision 13 December 2017

Abstract

Mosquito sampling using efficient traps that can assess species diversity and/or presence of dominant vectors is important for understanding the entomological risk of mosquito-borne disease transmission. Here, we present results from a survey of mosquito species sampled with ovitraps in a neotropical rainforest of Costa Rica. We found the method to be an efficient sampling tool. With a total sampling effort of 29 traps, we collected 157 fourth-instar larvae and three pupae belonging to eight mosquito taxonomic units (seven species and individuals from a homogenous taxonomic unit identified to the genus level). In our samples, we found two medically important species, *Sabethes chloropterus* (Humboldt) and *Trichoprosopon digitatum* (Rondani). The former is a proven vector of Yellow Fever in sylvatic environments and the later has been found infected with several arboviruses. We also found that mosquito species abundance and diversity increased with canopy cover and in environments where leaf litter dominated the ground cover. Finally, our results suggest that ovitraps have a great potential for systematic sampling in longitudinal and cross-sectional ecological "semi-field" studies in neotropical settings.

Key words: biodiversity, canopy cover, disease vector, mosquito sampling, regression tree

Mosquito species (Diptera: Culicidae) abundance and diversity are key parameters to understand the entomological risk of mosquito-borne disease transmission (Brown et al. 2008) and, more generally, the landscape eco-epidemiology of vector-borne diseases (Reisen 2010). For example, increased mosquito diversity has been associated with a decrease in the infection rate of dominant vector species (Chaves et al. 2011). Moreover, the study of abundance and diversity patterns in mosquitoes has the potential to uncover inter-specific interactions between mosquitoes that might be useful to "naturally" control major vector species, especially in the aquatic stages (Miyagi and Toma 1980).

Mosquito species diversity also seems to play a role in current global invasions by major mosquito vector species (Lounibos 2002). For example, in Costa Rica, the Asian Tiger mosquito, *Aedes albopictus* (Skuse) (Diptera: Culicidae), has been reported as occurring in microenvironments where its co-occurrence with other mosquito species is very limited (Calderón Arguedas et al. 2012). In Costa Rica, environments where *Ae. albopictus* has been found are agricultural areas whose overall diversity is reduced by the monoculture nature of commodity crops for export (Chaves et al. 2015b, Futami et al. 2015). More specifically, persistent infestations by *Ae. albopictus* have been observed in the Sarapiqui county, Heredia Province, North Eastern Costa Rica. This area is dominated by the production of pineapples for export (Chaves et al. 2015b), but sizeable patches of natural tropical rainforest remain (Vargas 2006). In Sarapiqui, *Ae. albopictus* females have been found infected with dengue virus serotypes DENV-1, DENV-2, and DENV-4 (Calderón-Arguedas et al. 2015). Then a relevant question is the evaluation of mosquito diversity patterns associated with the different environmental gradients that emerge in heterogeneous landscapes like the one of Sarapiqui. For example, gradients in canopy or ground cover are known to be associated with overall mosquito species diversity and abundance (Chaves et al. 2015a, Chaves 2016), but also with the abundance, or presence, of dominant vector species like *Ae. albopictus* (Tsuda et al. 2003).

Ovitraps have been frequently used to study mosquito species diversity and abundance in temperate East Asia, where *Ae. albopictus* is a widespread common species (Moriya 1974). Ovitraps

© The Author(s) 2018. Published by Oxford University Press on behalf of Entomological Society of America.
All rights reserved. For permissions, please e-mail: journals.permissions@oup.com.

Rev Biomed 2017; 28:79-88 DOI: https://doi.org/10.32776/revbiomed.v28i2.572
Artículo Original

Nuevos registros de Aedes albopictus (Skuse) en cuatro localidades de Costa Rica

Diana Rojas-Araya[1], Rodrigo Marín-Rodríguez[2], Manuel Gutiérrez-Alvarado[2], Luis Mario Romero-Vega[1], Olger Calderón-Arguedas[1], Adriana Troyo[1]

[1] Laboratorio de Investigación en Vectores (LIVE), Centro de Investigación en Enfermedades Tropicales (CIET), Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica.
[2] Programa Nacional de Control de Vectores. Ministerio de Salud, Costa Rica.

RESUMEN

Introducción. *Aedes albopictus* (Skuse) es un vector de arbovirus ampliamente distribuido. En Costa Rica, la expansiónageográfic de *Ae. albopictus* se ha incrementado en la última década, por lo que es importante actualizar el conocimiento sobre su distribución.

Objetivo. Informar sobre el hallazgo de *Aedes albopictus* en nuevas localidades de Costa Rica.

Materiales y Métodos. Se colectaron formas inmaduras de mosquitos con morfología sugestiva de *Ae. albopictus* en localidades de las provincias de Puntarenas (isla de Chira y Golfit) , Guanacaste (Liberia), Alajuela (Upala), San José (Acosta) y Heredia (Sarapiquí). Los especímenes fueron fijdos en etanol al 70%, aclarados en lactofenol e identificdos con el uso de claves dicotómicas.

Resultados. Las especies identificdas fueron *Ae. albopictus, Aedes aegypti, Haemagogus equinus* y *Haemagogus iridocolor-H. lucifer*. Las de *Ae. albopictus* procedieron de los siguientes depósitos: recipiente plástico, tanque de agua, lona plástica, balde, llanta, canoa, piscina, maceta y bota de hule. Se reporta la presencia de *Ae. albopictus* en Liberia (Guanacaste), isla de Chira y Golfit (Puntarenas) y Upala (Alajuela).

Conclusiones. Se evidencia la expansión que ha experimentado *Ae. albopictus* en Costa Rica. Se enfatiza la necesidad de un diagnóstico microscópico certero, pues las larvas de *Ae. albopictus* pueden coexistir con otras especies que resultan difíciles de diferenciar, tales como *Ae. aegypti* y algunas especies de *Haemagogus*. Considerando que *Ae. albopictus* es un vector competente para virus dengue (DENV), chikungunya (CHIKV) y Zika (ZIKV), se recomienda investigar su papel en la transmisión de virus en estas zonas, así como el desplazamiento y/o coexistencia con especies como *Ae. aegypti*.

Palabras clave: dengue, chikungunya, Zika, *Aedes albopictus*, Culicidae, Costa Rica.

Titulo corto: Nuevos registros de *Aedes albopictus* en Costa Rica

Nuevos registros de Aedes albopictus (Skuse) Autor para correspondencia: Diana Rojas Araya, Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica, Código Postal 2060, San José, Costa Rica. E-mail: diana.rojas_a@ucr .ac.crx

Recibido: el 24 de abril de 2017 Aceptado para publicación: el 03 de mayo de 2017

Copyright © 2017 por autores (s) y Revista Biomédica.
Este trabajo esta licenciado bajo las atribuciones de la Creative Commons (CC BY).
http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/

Este documento está disponible en https://doi.org/10.32776/revbiomed.v28i2.575

microorganisms

MDPI

Article

Malaria Elimination in Costa Rica: Changes in Treatment and Mass Drug Administration

Luis F. Chaves [1,*], John H. Huber [2], Obdulio Rojas Salas [3], Melissa Ramírez Rojas [1], Luis M. Romero [4], José M. Gutiérrez Alvarado [1], T. Alex Perkins [2], Monica Prado [5] and Rodrigo Marín Rodríguez [1]

1 Vigilancia de la Salud, Ministerio de Salud, San José, San José 10123-1000, Apartado Postal, Costa Rica; melissa.ramirez@misalud.go.cr (M.R.R.); baduel72@gmail.com (J.M.G.A.); rodrigo.marin@misalud.go.cr (R.M.R.)
2 Department of Biological Sciences, University of Notre Dame, Notre Dame, IN 46556, USA; jhuber3@nd.edu (J.H.H.); taperkins@nd.edu (T.A.P.)
3 Programa Nacional de Manejo de Vectores, Región Huétar Norte, Ministerio de Salud, Muelle de San Carlos, Alajuela 21006, Código Postal, Costa Rica; obdulio.rojas@misalud.go.cr
4 Departamento de Patología, Escuela de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional, Heredia, Heredia 304-3000, Apartado Postal, Costa Rica; luis.romero.vega@una.cr
5 Unidad de Investigación en *Plasmodium*, Centro de Investigación en Enfermedades Tropicales (CIET), Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica, San Pedro, San José 11501-2060, Apartado Postal, Costa Rica; monica.pradoporras@ucr.ac.cr
* Correspondence: lfchavs@gmail.com

Received: 17 April 2020; Accepted: 11 May 2020; Published: 30 June 2020

check for updates

Abstract: Costa Rica is a candidate to eliminate malaria by 2020. The remaining malaria transmission hotspots are located within the Huétar Norte Region (HNR), where 90% of the country's 147 malaria cases have occurred since 2016, following a 33-month period without transmission. Here, we examine changes in transmission with the implementation of a supervised seven-day chloroquine and primaquine treatment (7DCPT). We also evaluate the impact of a focal mass drug administration (MDA) in January 2019 at Boca Arenal, the town in HNR reporting the greatest local transmission. We found that the change to a seven-day treatment protocol, from the prior five-day program, was associated with a 98% reduction in malaria transmission. The MDA helped to reduce transmission, keeping the basic reproduction number, R_T, significantly below 1, for at least four months. However, following new imported cases from Nicaragua, autochthonous transmission resumed. Our results highlight the importance of appropriate treatment delivery to reduce malaria transmission, and the challenge that highly mobile populations, if their malaria is not treated, pose to regional elimination efforts in Mesoamerica and México.

Keywords: malaria; *Plasmodium vivax*; *Anopheles albimanus*; illegal mining; migration; Costa Rica

1. Introduction

Malaria has been a major infectious disease in Costa Rica's history [1,2]. Costa Rica is now among the 21 countries most likely to eliminate malaria by 2020 [3]. To achieve elimination, a robust malaria surveillance system has played a key role in order to understand and reduce malaria transmission [4]. In 1957, Costa Rica created a malaria surveillance and control program (MSCP) following Pan American Health Organization (PAHO) recommendations, and based malaria surveillance on passive case detection by the blood slide examination of patients with malaria symptoms in endemic areas [5,6].

MSCP's main initial strategy was the systematic use of DDT for indoor residual spraying (IRS) [6]. With this, malaria disappeared from endemic areas across the Pacific basin of Costa Rica [5–7]. DDT was