

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA
Facultad de Ciencias y Humanidades



Excelencia que trasciende

DELVALLE
GRUPO EDUCATIVO

Tasa de infección por ortobunyavirus (*Bunyaviridae*) en zancudos *Culex (Melanoconion) taeniopus* Dyar y Knab 1907 colectados en un área rural de Puerto Barrios, Izabal, durante los años 2007-2009

Trabajo de investigación presentado por
Oscar Fernando de León Osorio
para optar al grado de Licenciado en Bioquímica y Microbiología

Guatemala
2010

Página dejada en blanco intencionalmente.

Tasa de infección por ortobunyavirus (*Bunyaviridae*) en zancudos *Culex (Melanoconion) taeniopus* Dyar y Knab 1907 colectados en un área rural de Puerto Barrios, Izabal, durante los años 2007-2009

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA
Facultad de Ciencias y Humanidades



Excelencia que trasciende

DELVALLE
GRUPO EDUCATIVO

Tasa de infección por ortobunyavirus (*Bunyaviridae*) en zancudos *Culex (Melanoconion) taeniopus* Dyar y Knab 1907 colectados en un área rural de Puerto Barrios, Izabal, durante los años 2007-2009

Trabajo de investigación presentado por
Oscar Fernando de León Osorio
para optar al grado de Licenciado en Bioquímica y Microbiología


Guatemala
2010

Vo.Bo.:


(f) 

María Eugenia Morales-Betoulle, PhD


Tribunal

(f) 


María Eugenia Morales-Betoulle, PhD

(f) 

Alejandra Estévez, PhD

(f) 

Adrián Francisco Gil, PhD
Director a.i.



Fecha de aprobación: 23 de Junio de 2010

PREFACIO

Este trabajo fue parcialmente financiado por los Acuerdos Cooperativos CDC-CAP/CES-UVG vigentes desde 2007 hasta 2010. Este trabajo también fue financiado en parte por los proyectos FODECYT 03-2007 y FODECYT 34-2008. La información generada con este trabajo va a complementar una serie de estudios acerca de la posible transmisión de arbovirus (flavivirus, alphavirus y bunyavirus) por el zancudo *Culex (Melanoconion) taeniopus*. Estos estudios fueron financiados por las mismas líneas y fueron ejecutados por el equipo del CES-UVG que investiga la ecología de arbovirus y otros virus zoonóticos en varias regiones de Guatemala (ArboZoo).

Quiero agradecer a todo el personal del equipo ArboZoo, del Centro de Estudios en Salud y de la Universidad del Valle de Guatemala por toda la ayuda y el apoyo brindado durante la realización de este trabajo. Agradezco especialmente a: Lourdes Monzón, Ramón Medrano, Danilo Álvarez y Jean-Luc Betoulle por todo lo que aprendí en el trabajo de campo. A Silvia Sosa, María Luisa Müller y Bernarda Molina por su excelente trabajo como entomólogas y su apoyo y comprensión. A mis compañeras de laboratorio: María Reneé, Ana Silvia, Ana Lucía y Silvia Ramírez. A todos los colaboradores de DVBID en Fort Collins, especialmente a Nick Panella y Nicholas Komar. Al resto del equipo ArboZoo, que directa o indirectamente me apoyaron en la realización de este trabajo.

Agradezco a mi asesora principal de tesis, Dra. María Eugenia Morales-Betoulle por confiar en mí desde que comencé como su alumno en la UVG, y permitirme formar parte de su equipo de trabajo. A la Dra. Alejandra Estévez, por sus sugerencias y paciencia como asesora de mi trabajo de tesis. A la Dra. Pamela Pennington, por todo su apoyo y guía como Directora del Departamento de Bioquímica y Microbiología.

Finalmente agradezco a mi familia y amigos, que siempre estuvieron a mi lado y me apoyaron durante el difícil pero divertido camino de la UVG.

CONTENIDO

	Página
Prefacio	v
Lista de figuras	viii
Lista de cuadros	ix
Lista de gráficas	x
Resumen	xi
Capítulos	
I. Introducción	1
II. Antecedentes	3
A. Los bunyavirus	3
1. Estructura de los virus	3
2. Estructura y organización del genoma	4
3. Replicación	6
B. Estudios basados en el genoma viral	7
C. Principales enfermedades asociadas a los bunyavirus	8
D. Ecología y distribución	9
E. Artrópodos vectores de bunyavirus	10
III. Justificación	13
IV. Objetivos	15
A. General	15
B. Específicos	15

V.	Hipótesis	16
VI.	Marco metodológico	17
	A. Procedimiento	17
	1. Muestreo	17
	2. Procesamiento de zancudos colectados	19
	3. Pruebas de laboratorio	20
	B. Análisis estadístico	24
VII.	Resultados y discusión	25
	A. Detección de ortobunyavirus en zancudos	25
	1. Optimización del ensayo de RT-PCR para la detección de ortobunyavirus	25
	2. Detección de ortobunyavirus en <i>Cx. taeniopus</i>	27
	B. Tasa de infección por bunyavirus en <i>Cx. taeniopus</i>	27
	C. Prueba de hipótesis	33
	D. Densidad relativa de <i>Cx. taeniopus</i>	34
VIII.	Conclusiones	39
IX.	Recomendaciones	40
X.	Bibliografía	41
XI.	Apéndice A	50
XII.	Apéndice B	51

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Esquema de corte transversal de un virión típico de la familia <i>Bunyaviridae</i> .	4
2. Ilustración de la reorganización genómica en un bunyavirus.	5
3. Ciclo de replicación de los virus de la familia <i>Bunyaviridae</i> .	7
4. Transmisión de bunyavirus por artrópodos en la naturaleza.	10
5. Hembra adulta de <i>Cx. taeniopus</i> .	12
6. Sitios de estudio.	18
7. Esquema del programa de RT-PCR utilizado para amplificar ARN de ortobunyavirus.	22
8. Ensayo inicial de RT-PCR para detección de ortobunyavirus.	26
9. Ensayo optimizado de RT-PCR para detección de ortobunyavirus.	26
10. Fotografía de los productos de amplificación del RT-PCR Cal/Bwa para detección de ortobunyavirus.	28

LISTA DE CUADROS

Cuadro	Página
1. Lotes de <i>Cx. taeniopus</i> no-alimentadas y alimentadas, positivos para ortobunyavirus	30
2. Resultados de la prueba de hipótesis para la tasa de infección por ortobunyavirus	33

LISTA DE GRÁFICAS

Gráfica	Página
1. Tasas de infección (MLE y MIR) por bunyavirus en <i>Cx. taeniopus</i> , 2007-2009	32
2. Densidades de <i>Cx. taeniopus</i> , 2007-2009	36
3. Tasa de infección (MLE) por bunyavirus y densidad relativa mensual de <i>Cx. taeniopus</i> , 2007-2009	37

RESUMEN

Los virus transmitidos por artrópodos a los vertebrados, también llamados arbovirus, pueden representar un problema para la salud humana. Los ortobunyavirus (*Orthobunyavirus: Bunyaviridae*) son un género de arbovirus transmitidos principalmente por zancudos hematófagos. Los zancudos más observados como vectores de los ortobunyavirus pertenecen al género *Culex* (Diptera: Culicidae). En Guatemala se ha aislado ortobunyavirus de zancudos *Culex (Melanoconion) taeniopus* Dyar y Knab 1907 en varias ocasiones. Además, hay dos casos de enfermedad humana por ortobunyavirus reportados en Guatemala. Ambos casos se originaron en hábitats rurales con actividad documentada de *Cx. taeniopus*. El aislamiento de estos virus en hábitats rurales con transmisión viral activa sugiere que los zancudos *Cx. taeniopus* podrían estar implicados en la ecología de los ortobunyavirus. El estudio realizado tuvo como objetivo estimar la tasa de infección de los ortobunyavirus en poblaciones de *Cx. taeniopus* capturados en dos hábitats rurales de Puerto Barrios, Izabal, durante el período de 2007 a 2009.

Se optimizó un ensayo para la detección de ARN de ortobunyavirus en *Cx. taeniopus*. Utilizando este ensayo se analizó 114 lotes de *Cx. taeniopus* hembra, que contenían un total de 2942 zancudos. Se detectó ARN de ortobunyavirus en 15 lotes. En base a estos resultados se estimó la tasa de infección por ortobunyavirus en *Cx. taeniopus*. Se encontró que en los años 2007 y 2008 hubo actividad de bunyavirus con tasas de infección significativamente mayores a 1 zancudo infectado por cada 1000 zancudos.

Se observó que la densidad relativa de *Cx. taeniopus* disminuyó anualmente y no fue posible la detección de bunyavirus en 2009. Sin embargo, se considera importante continuar estudiando la biología de *Cx. taeniopus* para determinar su importancia como posible vector de bunyavirus en Guatemala.

I. INTRODUCCIÓN

Los bunyavirus (familia *Bunyaviridae*) son virus de ARN, envueltos, con genoma segmentado. De los cinco géneros que pertenecen a la familia, cuatro contienen virus que pueden infectar hospederos vertebrados. Tres de los géneros de bunyavirus que infectan vertebrados pueden ser transmitidos por artrópodos hematófagos (Schmaljohn y Nichol 2007). Entre los vectores de estos virus se incluye una gran variedad de zancudos, algunos de los cuales se encuentran en Guatemala (Morales-Betoulle *et al.*, datos no publicados). Los virus transmitidos por artrópodos hematófagos son llamados arbovirus (como abreviación de *arthropod-borne virus*, o virus acarreados por artrópodos). La definición de arbovirus, establecida por la Organización Mundial de la Salud (OMS 1985b:8) es:

«Los arbovirus son virus que se perpetúan en la naturaleza principalmente, o en gran medida, gracias a la transmisión biológica entre huéspedes vertebrados sensibles efectuada por artrópodos hematófagos, o mediante la transmisión transovárica y posiblemente venérea en artrópodos; los virus se reproducen y causan viremia en los vertebrados, se multiplican en los tejidos de artrópodos y, después de un período de incubación extrínseca, son transmitidos a otros vertebrados mediante las picaduras de los artrópodos.»

Ésta es la definición que es utilizada en este trabajo para considerar a los bunyavirus como arbovirus, con la aclaración que la palabra *huéspedes*, sugerida en la traducción del documento original (OMS 1985a:8), fue reemplazada por la palabra *hospederos*, ya que esta última se apega mejor al sentido original.

Actualmente la taxonomía de los virus es arbitrada por una rama de la *International Union of Microbiological Societies*, el Comité Internacional para la Taxonomía de los Virus (ICTV, por las siglas del nombre en inglés: *International Committee on Taxonomy of Viruses*). Esta entidad publica los nombres aceptados de virus y sus respectivas abreviaciones. Según la normativa del ICTV (Frauquet *et al.* 2005), los virus se clasifican en cinco taxones: orden, familia, subfamilia, género y especie. Por ejemplo: *Bunyamwera virus* (*Ortobunyavirus: Bunyaviridae*), donde se muestra la especie, seguida por el género y la familia, entre paréntesis, separados por un signo de dos puntos. Para tener más exactitud y mantenerse en conformidad con las normativas internacionales, en el presente trabajo se utilizó la nomenclatura oficial establecida por el ICTV, vigente en enero de 2011.

Este estudio fue realizado en el marco del proyecto FODECYT 34-2008: Implementación del diagnóstico molecular de bunyavirus utilizando zancudos del género *Culex* como fuente de material genético. El trabajo de campo fue realizado por miembros del equipo ArboZoo durante los años 2007 a 2009, en el contexto de los Acuerdos Cooperativos CDC-CAP/CES-UVG vigentes durante ese período. El objetivo del estudio realizado fue estimar la tasa de infección por bunyavirus en zancudos *Culex (Melanoconion) taeniopus* Dyar y Knab 1907 colectados durante los años 2007-2009 en un área rural de Puerto Barrios, Izabal, Guatemala.

II. ANTECEDENTES

A. Los bunyavirus

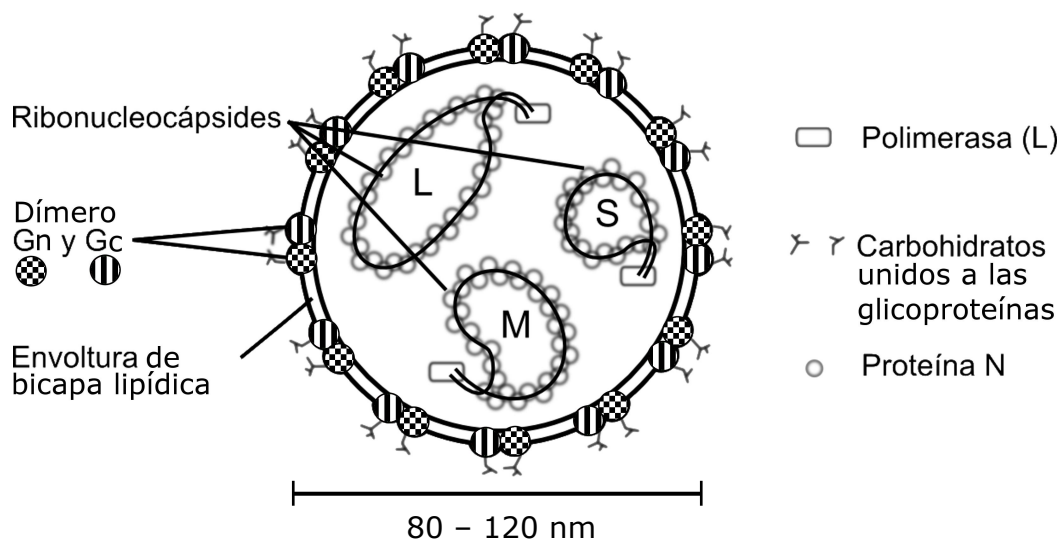
La familia *Bunyaviridae* comprende un grupo grande de arbovirus, compuesto por más de 300 especies (Soldan y González-Scarano 2005). Está dividida en los géneros *Orthobunyavirus*¹, *Hantavirus*, *Nairovirus* y *Phlebovirus*, con virus que pueden infectar vertebrados, y el género *Tospovirus*, con virus que infectan plantas (Schmaljohn y Hooper 2001). La mayoría de bunyavirus² son transmitidos por artrópodos, excepto los pertenecientes al género *Hantavirus* (Schmaljohn y Hooper 2001). Cada hantavirus se encuentra asociado a una especie de roedor (subfamilias Sigmodontinae, Murinae y Arvicolinae) como hospedero natural, con la que se ha relacionado por cientos de miles de años (Zeier *et al.* 2005).

1. Estructura de los virus. Los viriones son esféricos y presentan proyecciones de glicoproteínas de superficie (Gn y Gc), incrustadas en una envoltura lipídica (Schmaljohn y Hooper 2001). La envoltura lipídica está derivada de membranas de las células del hospedero (Borucki *et al.* 2002). El interior de los viriones tiene la apariencia de un collar de perlas, posiblemente debido a la presencia de ribonucleocápsides (Figura 1, en la página 4). En éstas, los tres segmentos de ARN del genoma se encuentran formando un complejo con la proteína de la nucleocápside (N). Las ribonucleocápsides están empacadas, junto con la polimerasa de ARN dependiente de ARN (RdRp, por sus siglas en inglés), dentro de la envoltura lipídica (Schmaljohn y Hooper 2001).

¹ Antes, el género *Orthobunyavirus* se conocía como *Bunyavirus* (Schmaljohn y Nichol 2007, Soldan y González-Scarano 2005, Schmaljohn y Hooper 2001). *Orthobunyavirus* es el nombre aceptado actualmente por el ICTV (ICTVdb Management 2006).

² En publicaciones anteriores al 2003, el término bunyavirus se refería a los virus del género *Orthobunyavirus*. A partir del 2003 se utiliza para referirse a cualquiera o todos los virus de la familia *Bunyaviridae*. Es equivalente al término en inglés, en singular. El plural en inglés es *bunyaviruses*.

Figura 1: Esquema de corte transversal de un virión típico de la familia *Bunyaviridae*.



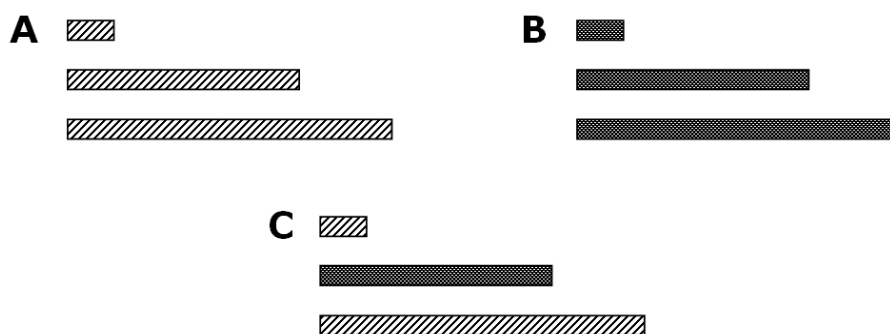
Las ribo-nucleocápsides (ARN genómico y proteína N) están asociadas a la proteína L (Modificado de Schmaljohn y Nichol 2007).

2. Estructura y organización del genoma. Los bunyavirus tienen un genoma segmentado de ARN. El genoma consta de tres segmentos, llamados grande, mediano y pequeño (segmento L, M y S, respectivamente, por sus siglas en inglés). El segmento L codifica la RdRp (proteína L) con una estrategia de transcripción-traducción (polaridad) de sentido negativo. El segmento M codifica las glicoproteínas de superficie Gn y Gc con una polaridad negativa. En algunos géneros (*Orthobunyavirus*, *Phlebovirus* y *Tospovirus*) el segmento M también codifica una proteína no estructural (NS_M), en el mismo marco abierto de lectura (ORF, por sus siglas en inglés). El segmento S codifica la proteína de la nucleocápside (N) con una polaridad negativa. En los ortobunyavirus también codifica una proteína no estructural (NS_S), en un ORF traslapado. Los virus de los géneros *Phlebovirus* y *Tospovirus* utilizan una estrategia ambisentido para expresar dos proteínas, N y NS_S (Schmaljohn y Hooper 2001).

Se ha observado la capacidad de reorganización génica en virus de los géneros *Orthobunyavirus* (virus de los serogrupos Bunyamwera, California y Grupo C), *Hantavirus* y *Nairovirus* (de Brito *et al.* 2007, Reese *et al.* 2008). Esta reorganización se puede dar en células con infección dual por bunyavirus relacionados (mismo género). Al replicarse los dos virus en la misma célula, los segmentos del genoma se pueden reorga-

nizar al empacarse el virión (de Brito *et al.* 2007). Se ha conseguido obtener virus con genoma reorganizado al infectar zancudos en el laboratorio, con una tasa alta de reorganización. A pesar de esto, no se ha podido observar reorganización del genoma viral en mamíferos pequeños (Borucki *et al.* 2002). Recientemente se comprobó la reorganización del genoma de *La Crosse virus* (LACV, *Orthobunyavirus: Bunyaviridae*) en la naturaleza. Zancudos *Aedes triseriatus* de regiones donde circulan dos genotipos del virus mostraron infección por un tercer genotipo, que contenía segmentos del genoma de los dos virus (Reese *et al.* 2008). En la Figura 2 se muestra un ejemplo.

Figura 2: Ilustración de la reorganización genómica en un bunyavirus.



Cada panel es una representación de un genoma tripartito. Si una célula susceptible es infectada a la vez por dos virus A y B diferentes pero relacionados, el ensamblaje viral podría generar un virus reorganizado C, con segmentos de ambos virus. Una misma infección dual puede generar muchos virus reorganizados.

Los bunyavirus tienen una secuencia terminal conservada (STC) en los extremos 5' y 3' de sus tres segmentos. Esta secuencia permite un apareamiento de los extremos, generando una estructura estable de ARN circular de unión no covalente, incluso al estar asociado con la proteína N (Schmaljohn y Hooper 2001). Estudios en LACV muestran que la STC es complementaria a partes del ARNm de genes conservados en zancudos del género *Aedes* y otros dípteros. Este ARNm es utilizado como cebador para la replicación y transcripción del genoma viral en el artrópodo (Borucki *et al.* 2002). Esa interacción entre virus-vector podría explicar la alta conservación de la STC. Otra función de la STC ha sido observada en *Bunyamwera virus* (BUNV) mediante estudios de mutagénesis dirigida. En estos estudios se observó que algunos nucleótidos de las STC son esenciales para la señalización de la transcripción (Barr y Wertz 2005, Barr *et al.* 2005). Estas características de

los ortobunyavirus han sido utilizadas para realizar estudios del genoma viral (ver sección *Estudios basados en el genoma viral*, en la página 7).

3. Replicación. El primer paso para la replicación del virus (Figura 3, en la página 7) es la unión del virus a la célula, mediada por las glicoproteínas virales y receptores celulares (Schmaljohn y Hooper 2001). Para LACV, se propone Gn como ligando de los receptores celulares de vertebrados. Esta proteína se ha asociado a la capacidad del virus de alcanzar altas viremias en la circulación periférica (virulencia periférica). También se ha asociado a su capacidad para invadir tejido nervioso (neuroinvasividad) (Borucki *et al.* 2002). Se ha propuesto que la proteína Gc puede ser un ligando de los receptores celulares en los zancudos. También se ha involucrado a la proteína Gn como ligando en tejidos específicos de zancudos (Schmaljohn y Hooper 2001, Borucki *et al.* 2002). En un segundo paso, el virión ingresa a la célula blanco mediante fagocitosis. Se cree que la acidificación del endosoma induce un cambio conformacional en Gn y Gc, facilitando la fusión de las membranas viral y celular y permitiendo la entrada de las ribonucleocápsides y la RdRp al citoplasma (Schmaljohn y Hooper 2001).

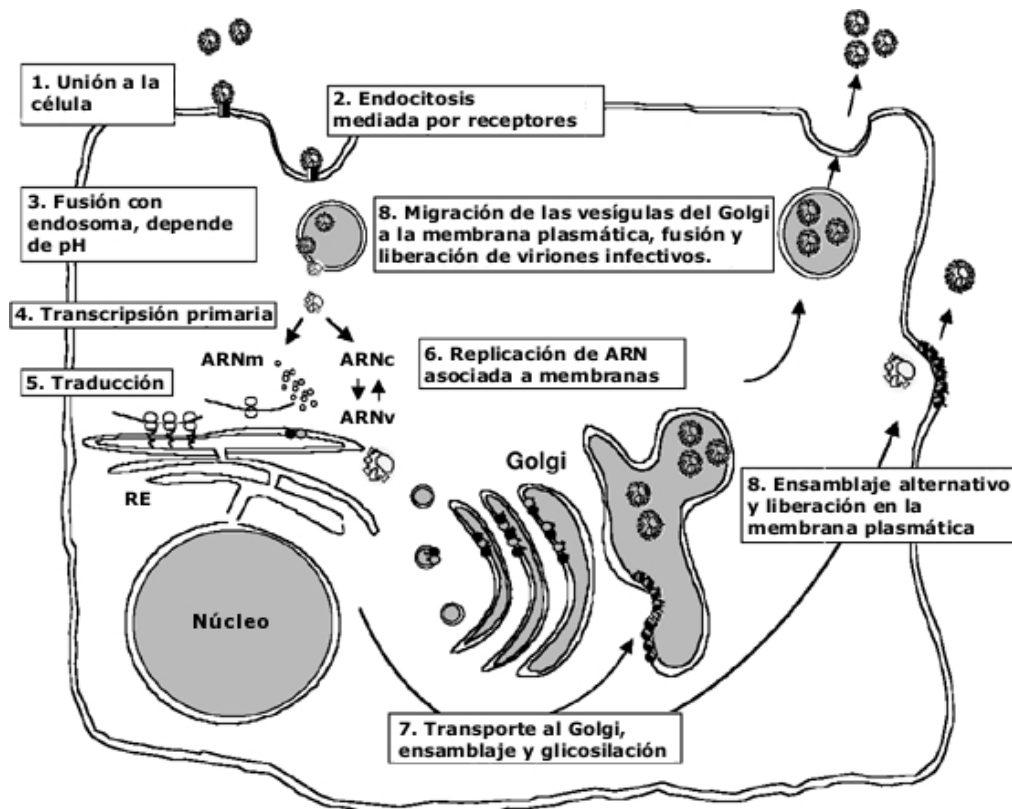
En el citoplasma, ocurre la transcripción primaria del ARNm a partir de plantillas del genoma. Para esto se utiliza cebadores metilados, derivados de ARN mensajero del hospedero (Schmaljohn y Hooper 2001). *Bunyaviridae* es la única familia de arbovirus que utiliza cebadores de transcripción derivados del hospedero (Borucki *et al.* 2002). Se ha observado que solamente son necesarias las proteínas L y N para la transcripción del ARN viral (Kukkonen *et al.* 2005). La traducción del ARNc generado a partir de los segmentos L y S se realiza por ribosomas libres. La traducción del ARNc del segmento M es realizada por ribosomas unidos a membrana, en el retículo endoplasmático rugoso. La transcripción del genoma completo a ARNc es realizada por la RdRp. Se presume que para esto es necesaria la proteína N, pero no se ha identificado los factores virales o celulares asociados (Schmaljohn y Hooper 2001). Se ha sugerido que la proteína N actúa como una chaperona de ARN (Mir y Panganiban 2006).

La morfogénesis incluye la acumulación de las glicoproteínas primarias Gn y Gc en el aparato de Golgi, glicosilación N-terminal y adquisición de membranas modificadas del

hospedero por gemación hacia adentro de la cisterna del Golgi. Después hay una fusión de las vesículas citoplásmicas con la membrana plasmática y se libera los viriones maduros (Schmaljohn y Hooper 2001).

Se ha observado diferencias entre la replicación en hospederos vertebrados y zancudos. Aparentemente, algunos procesos de regulación asociados a la transcripción del genoma viral a ARNm están fuertemente controlados por el metabolismo de los ovarios de los zancudos. Estos procesos permitirían una transmisión transovárica muy efectiva, generando progenie infectada (Borucki *et al.* 2002).

Figura 3: Ciclo de replicación de los virus de la familia *Bunyaviridae*.



Fuente: Tomado y modificado de Schmaljohn y Nichol 2007.

B. Estudios basados en el genoma viral

Históricamente se clasificaba los bunyavirus en base a sus relaciones antigénicas (Schmaljohn y Hooper 2001). Se utilizaba pruebas como fijación del complemento, neutralización e inhibición de la hemoaglutinación para determinar esas relaciones (Nunes

et al. 2005). En base a las propiedades determinadas por estas pruebas, se dividió los géneros en serogrupos. Los serogrupos, a su vez, eran divididos en complejos formados por virus estrechamente relacionados (Schmaljohn y Hooper 2001). Las propiedades antigénicas de los virus aún se utilizan para clasificarlos en serogrupos, pero se busca utilizar una clasificación basada en métodos moleculares, debido a la reproducibilidad, especificidad y rapidez de éstos (de Brito *et al.* 2007, Nakouné *et al.* 2007, Arai *et al.* 2008, Quinan *et al.* 2008, Yadav *et al.* 2008, Lambert y Lanciotti 2009).

Como resultado de la caracterización genética de algunos bunyavirus se cuenta con información para diseñar cebadores específicos. Se ha publicado una gran variedad de ensayos para detección de ácidos nucleicos de bunyavirus. En 2009 se publicó ensayos que permiten detectar 47 virus diferentes de la familia *Bunyaviridae* (Lambert y Lanciotti 2009). Para esto los investigadores diseñaron cebadores basados en secuencias de consenso de bunyavirus pertenecientes a distintos géneros y serogrupos. Con esa metodología lograron amplificar secuencias del segmento S de los virus analizados mediante reacciones de RT-PCR con múltiples cebadores (comúnmente llamadas múltiplex).

Otro enfoque para amplificar los ácidos nucleicos de bunyavirus es utilizar cebadores dirigidos a la secuencia terminal conservada (STC). Se ha utilizado variaciones de la STC del género *Ortobunyavirus* para detectar diversas especies (Dunn *et al.* 1994, Nunes *et al.* 2005, Nakouné *et al.* 2007, Lambert y Lanciotti 2008, Mores *et al.* 2009; M.E. Morales-Betoulle, comunicación personal).

C. Principales enfermedades asociadas a los bunyavirus

Entre los bunyavirus transmitidos por artrópodos se encuentra muchos virus zoonóticos. Los síndromes asociados a éstos son variados. Los bunyavirus presentes en América se asocian principalmente a dos síndromes: encefalítico (sobre todo serogrupos California y Bunyamwera) (Kuno *et al.* 1996) y febril (sobre todo Grupo C) (Nunes *et al.* 2005). Entre los bunyavirus más estudiados que causan encefalitis se encuentra *La Crosse virus*. La infección en niños con este virus provoca una encefalitis aséptica. La presencia de anticuerpos contra LACV se ha correlacionado con enfermedades mentales que requieren de cuidados especializados (Borucki *et al.* 2002, Reese *et al.* 2008).

Los ortobunyavirus del Grupo C causan comúnmente un síndrome febril, muy similar al presentado por una persona enferma con Dengue (Scherer et al 1983, Scherer et al 1986). Durante estudios de VEEV en Guatemala, dos investigadores del equipo contrajeron una enfermedad febril súbita con síntomas similares al Dengue. En ambos casos se identificó al agente causal como NEPV (Scherer *et al.* 1983).

D. Ecología y distribución

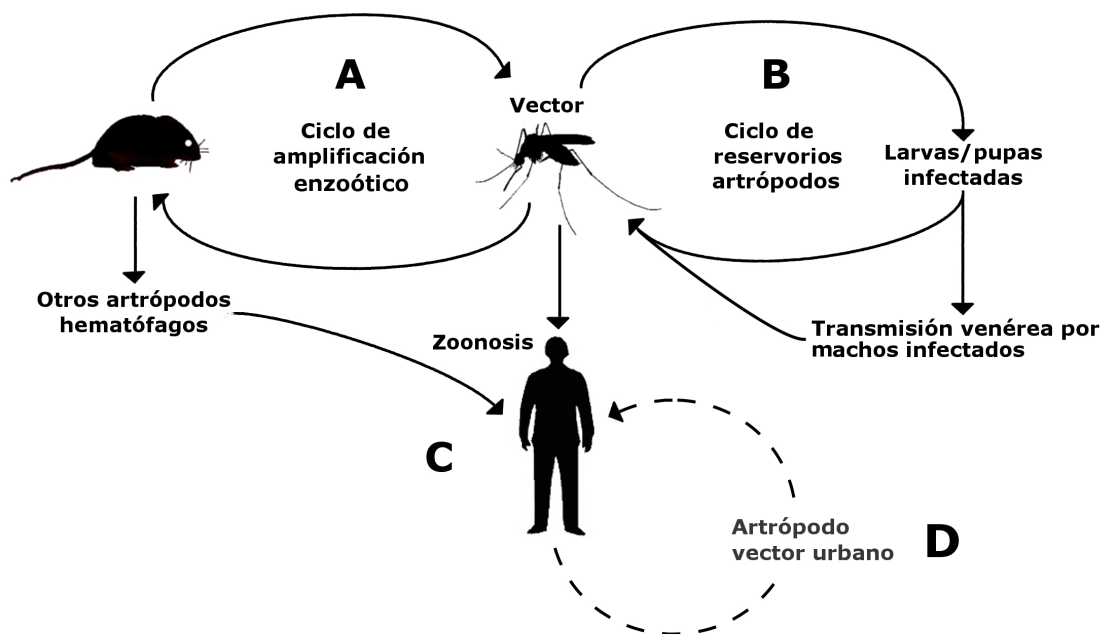
Los bunyavirus transmitidos por artrópodos se mantienen en la naturaleza principalmente por dos ciclos: ciclo en reservorios artrópodos y ciclo de amplificación en vertebrados (Figura 4, en la página 10). El ciclo en reservorios artrópodos perpetúa la transmisión del virus entre los zancudos (Figura 4B). Un zancudo hembra infectado puede transmitir verticalmente el virus a su descendencia (Borucki *et al.* 2002). Debido a la transmisión vertical, el virus puede sobrevivir el invierno en regiones templadas. Los zancudos macho infectados verticalmente pueden transmitir el virus, por vía venérea, a hembras no infectadas (Soldan y González-Scarano 2005).

En el ciclo de amplificación enzoótico se involucra la participación de mamíferos pequeños (Figura 4A). Al alimentarse de estos, las hembras infectadas pueden transmitir el virus al mamífero. El mamífero puede desarrollar una viremia corta y alta, con capacidad para infectar otros artrópodos hematófagos. Si un artrópodo infectado se alimenta de un humano (Figura 4C), puede ocurrir una infección zoonótica (Nichol 2001, Soldan y González-Scarano 2005). También se ha observado ciclos de amplificación urbana que originan epidemias (Figura 4D) (Moraes 2007). En los tres géneros de bunyavirus transmitidos por artrópodos se puede encontrar virus que utilizan como vector alguna especie de zancudo (Nichol 2001). Los ortobunyavirus utilizan como vectores principalmente zancudos, incluidos los géneros *Culex* y *Aedes* (Moraes 2007, Reese 2008).

La mayoría de estudios sobre bunyavirus, realizados en América tropical o subtropical, se originan principalmente en Brasil (Nunes 2005, de Brito 2007, Moraes 2007, Quinan 2008). En otros países se ha estudiado casos de infección humana por bunyavirus emergentes (Scherer *et al.* 1983, Tauro 2009). Entre 1968 y 1980 un equipo realizó estudios sobre *Venezuelan equine encephalitis virus* (VEEV, *Alphavirus: Togaviridae*) en Guatemala

(Scherer *et al.* 1976, Scherer *et al.* 1985, Cupp *et al.* 1986). Aunque el objetivo era analizar la ecología de VEEV, durante esos estudios se obtuvo 34 aislados de diversos ortobunyavirus. Entre los virus aislados se encontró 28 del grupo C y 6 del grupo PAT. En total, se identificó siete aislados como *Nepuyo virus* (NEPV) y tres como *Patois virus* (PATV). De estos virus, 31 fueron aislados de hámsteres centinela en La Avellana, Santa Rosa, y Puerto Barrios, Izabal (Scherer *et al.* 1985). Dos aislados de NEPV se obtuvieron de personas con enfermedad febril (Scherer *et al.* 1983). El único aislado viral de zancudos macerados provino de un grupo de *Cx. taeniopus* y fue identificado como NEPV (Cupp *et al.* 1986).

Figura 4: Transmisión de bunyavirus por artrópodos en la naturaleza.



Entre los vectores de los bunyavirus transmitidos por artrópodos se encuentra zancudos (principalmente para el género *Orthobunyavirus*), garrapatas (para el género *Nairovirus*), y moscas culicoides y flebotominas (para los géneros *Orthobunyavirus* y *Phlebotomus*, respectivamente). Los hospederos de amplificación son principalmente mamíferos pequeños.

E. Artrópodos vectores de bunyavirus

Los arbovirus de la familia *Bunyaviridae* utilizan una variedad de artrópodos para su transmisión en la naturaleza. Los ortobunyavirus utilizan como vectores principalmente zancudos, además de moscas culicoides y flebotominas (Nichol 2001). Entre los zancudos vectores de ortobunyavirus en América se encuentra varias especies del género *Aedes*

(LeDuc 1987, Borucki *et al.* 2002, Soldan y González-Scarano 2005, Moraes *et al.* 2007, Reese *et al.* 2008, Tauro *et al.* 2008) y varias especies del género *Culex* (Scherer *et al.* 1976, LeDuc 1987, Nunes *et al.* 2005, Soldan y González-Scarano 2005, Moraes *et al.* 2007, Tauro *et al.* 2008, Yadav *et al.* 2008).

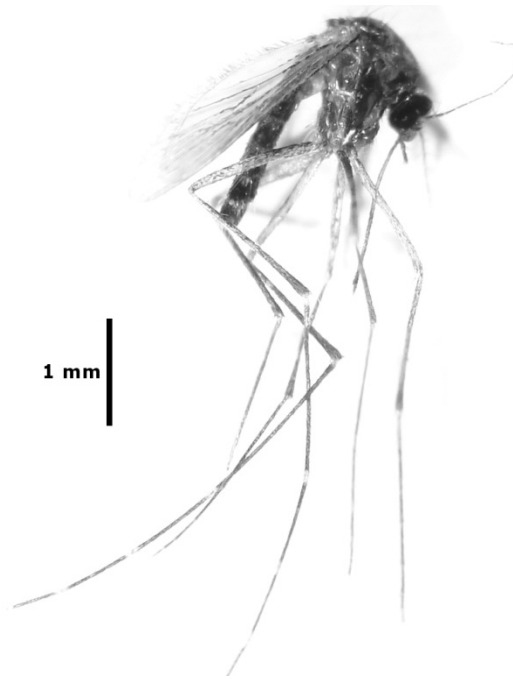
En Guatemala se aisló *Nepuyo virus* de zancudos *Culex (Melanoconion) taeniopus* (Diptera: Culicidae) (Cupp *et al.* 1986). La sistemática de estos zancudos ha sido muy discutida (Galindo 1969, Cupp *et al.* 1989, Williams y Savage 2009). Es generalmente aceptado que la identificación hasta especie de hembras adultas del subgénero *Melanoconion* es muy complicada y requiere mucha experiencia. Debido a esto, muchos zancudos son solamente identificados como pertenecientes al complejo *Cx. taeniopus* (Cupp *et al.* 1989). Las técnicas de identificación actuales son tediosas y consumen mucho tiempo. Si se encuentra que estos zancudos son vectores importantes de arbovirus será necesario desarrollar nuevas técnicas, más apropiadas para la identificación rutinaria (Cupp *et al.* 1989, Williams y Savage 2009).

Los zancudos del complejo *Cx. taeniopus* se encuentran distribuidos desde el norte de Suramérica hasta el sur de Florida y el Caribe (Cupp *et al.* 1989). Se ha encontrado que estos zancudos son comunes en hábitats boscosos y húmedos, y en áreas peridomiciliarias cercanas. La abundancia de hojas muertas y escombros de árboles es favorable para la presencia de formas inmaduras de *Cx. taeniopus* (Galindo 1969). En pocas ocasiones es posible encontrar los estadios larvarios en la naturaleza (M. Williams y H.M. Savage, comunicación personal). En hábitats modificados, principalmente los cercanos a bosques secundarios, *Cx. taeniopus* es uno de los grupos dominantes y presenta actividad desde el comienzo de la noche (Cupp *et al.* 1986, Forattini *et al.* 1991).

Se ha encontrado que las hembras de *Cx. taeniopus* (Figura 5, en la página 12) son atraídas por una variedad de hospederos vertebrados (Forattini *et al.* 1991). En Guatemala, se determinó que estos zancudos se alimentan principalmente de mamíferos, grandes y pequeños, incluidos los humanos, y aves. También se determinó que pueden llegar a alimentarse de reptiles, cuando estos se encuentran en un ambiente peridomiciliario (Cupp *et al.* 1986).

Cx. taeniopus es un vector conocido de arbovirus como el VEEV (Cupp *et al.* 1979, Scherer *et al.* 1987). El papel de *Cx. taeniopus* en la transmisión de bunyavirus ha sido sugerido por evidencia circunstancial. El aislamiento de bunyavirus a partir de *Cx. taeniopus* en un hábitat con transmisión del virus sugiere un papel de estos zancudos en la ecología viral (Cupp *et al.* 1986), pero no comprueba un papel como vector. La transmisión de diversos arbovirus por *Cx. taeniopus* ha sido evaluada de forma experimental. En base a esos estudios, se sospecha que *Cx. taeniopus* puede ser un vector de ortobunyavirus como *Caraparu virus*, *Oriboca virus* y *Guama virus* (Galindo y Srihongse 1967, Toda y Shope 1967).

Figura 5: Hembra adulta de *Cx. taeniopus*.



Espécimen disponible en la colección de referencia del Laboratorio de Entomología Sistemática, Departamento de Biología, Universidad del Valle de Guatemala. Para detalles de la identificación de las hembras *Cx. taeniopus* adultas consultar el Apéndice B, en la página 51.

III. JUSTIFICACIÓN

En el capítulo de antecedentes se expusieron las características generales de los virus de la familia *Bunyaviridae*. Entre los bunyavirus se encuentra una gran cantidad de virus que están involucrados en enfermedad humana (Schmaljohn y Nichol 2007). La mayor actividad de los bunyavirus se ha observado en regiones tropicales y subtropicales alrededor del mundo (Vasconcelos *et al.* 2001, Soldan y González-Scarano 2005). Los virus del género *Orthobunyavirus* (*Bunyaviridae*) son los más reportados en la región tropical y subtropical del continente americano (Scherer *et al.* 1983, Nunes *et al.* 2005, de Brito *et al.* 2007, Moraes 2007, Quinan *et al.* 2008, Tauro *et al.* 2009). Las infecciones humanas por ortobunyavirus se manifiestan típicamente por una enfermedad febril, muchas veces con síntomas similares al Dengue (Scherer *et al.* 1983, Scherer *et al.* 1986). Hay dos casos documentados de enfermedad humana causada por bunyavirus (NEPV) en Guatemala (Scherer *et al.* 1983). Ambos fueron asociados a la permanencia en zonas rurales similares a los sitios de estudio del presente trabajo.

Desde mediados del siglo XX se ha observado brotes de enfermedad causada por ortobunyavirus en América (Vasconcelos *et al.* 1998, Moraes 2007). Por ejemplo, variantes muy virulentas de *Oropouche virus* (*Orthobunyavirus: Bunyaviridae*) han causado brotes epidémicos de hasta 100 000 infecciones humanas en Brasil (Moraes 2007). Es generalmente aceptado que la aparición de arbovirus emergentes puede estar relacionada a la modificación del ambiente (Vasconcelos *et al.* 2001). La destrucción de hábitats naturales para realizar proyectos de urbanización se ha asociado a aumentos en la circulación de arbovirus. Se ha propuesto que este aumento es debido a la proliferación de artrópodos vectores (Dégallier *et al.* 1992). Otras actividades humanas, como la deforestación y el desarrollo agrícola, se han asociado al cambio en la distribución de zancudos vectores (Norris 2004). También se ha relacionado cambios climáticos con numerosos factores de riesgo para brotes de bunyavirus. Se ha observado que en estas situaciones los virus pueden adaptarse rápidamente a nuevos vectores (Elliott 2009). La adaptación de un virus a nuevos vectores puede facilitar el desarrollo de un ciclo de transmisión urbana (Moraes 2007, Elliott 2009).

La participación de zancudos del género *Culex* en la transmisión de bunyavirus en la naturaleza está bien documentada (Scherer *et al.* 1976, LeDuc 1987, Nunes *et al.* 2005, Soldan y González-Scarano 2005, Moraes *et al.* 2007, Tauro *et al.* 2008, Yadav *et al.* 2008). En Guatemala se encuentra varias especies de zancudos de este género (Equipo de investigación ArboZoo, CES-UVG, datos no publicados). En una serie de estudios en Guatemala, se obtuvo aislados de bunyavirus del género *Orthobunyavirus* (Scherer *et al.* 1976, Scherer *et al.* 1985, Cupp *et al.* 1986). Uno de estos aislados fue obtenido de zancudos *Culex (Melanoconion) taeniopus* (Cupp *et al.* 1986). Los aislamientos de ortobunyavirus del Grupo C en *Cx. taeniopus* de Guatemala (Cupp *et al.* 1986; M.E. Morales-Betoulle *et al.*, datos no publicados) sugieren que estos zancudos podrían estar implicados en la ecología de los bunyavirus en nuestro país.

Para que exista transmisión de un arbovirus en la naturaleza es necesaria al menos la presencia del virus, vectores competentes y hospederos susceptibles. Aunque esté documentada la presencia de vectores competentes, es necesario que los factores ambientales sean propicios para los zancudos. Entre estos factores se encuentra los días con lluvia y la presencia de cuerpos artificiales y naturales de agua. En Puerto Barrios, municipio en donde se ubican los sitios de este estudio, se ha documentado la presencia de *Cx. taeniopus* (ArboZoo, datos no publicados). Según datos meteorológicos (Instituto Nacional de Sismología, Vulcanología, Meteorología e Hidrología, Guatemala. INSIVUMEH) y de captura de zancudos en la zona de estudio se observa una relación entre los días con lluvia y un aumento en la abundancia de zancudos (Cordón-Rosales *et al.*, datos no publicados). Por otra parte, en Guatemala se ha aislado ortobunyavirus de *Cx. taeniopus* y algunos vertebrados. Recientemente, un ortobunyavirus del Grupo C fue aislado de *Cx. taeniopus* capturados en un sitio cercano a los sitios del presente estudio (M.E. Morales-Betoulle *et al.*, datos no publicados).

Según los datos anteriormente expuestos, se piensa que los sitios de estudio reúnen las condiciones apropiadas para la transmisión de ortobunyavirus por *Cx. taeniopus* en la naturaleza. Por todo esto, se consideró necesario determinar la tasa de infección por ortobunyavirus en zancudos de Guatemala, para poder estimar su importancia como posibles amenazas a la salud humana.

IV. OBJETIVOS

A. General

Estimar por métodos moleculares la tasa de infección por ortobunyavirus en zancudos *Culex (Melanoconion) taeniopus* colectados durante los años 2007-2009 en un área rural de Puerto Barrios, Izabal, Guatemala.

B. Específicos

1. Implementar en Guatemala pruebas de RT-PCR para la detección del segmento S del genoma de bunyavirus (*Bunyaviridae*) pertenecientes al género *Orthobunyavirus*.
2. Implementar en Guatemala pruebas de RT-PCR para la amplificación de la secuencia completa del segmento S del genoma de bunyavirus (*Bunyaviridae*) pertenecientes al género *Orthobunyavirus*.
3. Detectar la presencia de ortobunyavirus en grupos de *Cx. taeniopus* colectados en el sitio de estudio, durante los años 2007-2009.
4. Determinar si existe una relación entre la densidad relativa de *Cx. taeniopus* en los sitios de estudio y la tasa de infección por ortobunyavirus en los mismos, durante los años 2007-2009.

V. HIPÓTESIS

En los años 2007-2009 había ortobunyavirus detectables por RT-PCR en la población de *Cx. taeniopus* de un área rural de Puerto Barrios, Izabal. La tasa de infección por estos virus puede ser estimada en artrópodos mediante el uso de ensayos moleculares.

H₀: La tasa de infección por ortobunyavirus en los zancudos *Cx. taeniopus* del estudio es menor o igual a 1 zancudo infectado por cada 1000 zancudos.

H₁: La tasa de infección por ortobunyavirus en los zancudos *Cx. taeniopus* del estudio es mayor a 1 zancudo infectado por cada 1000 zancudos.

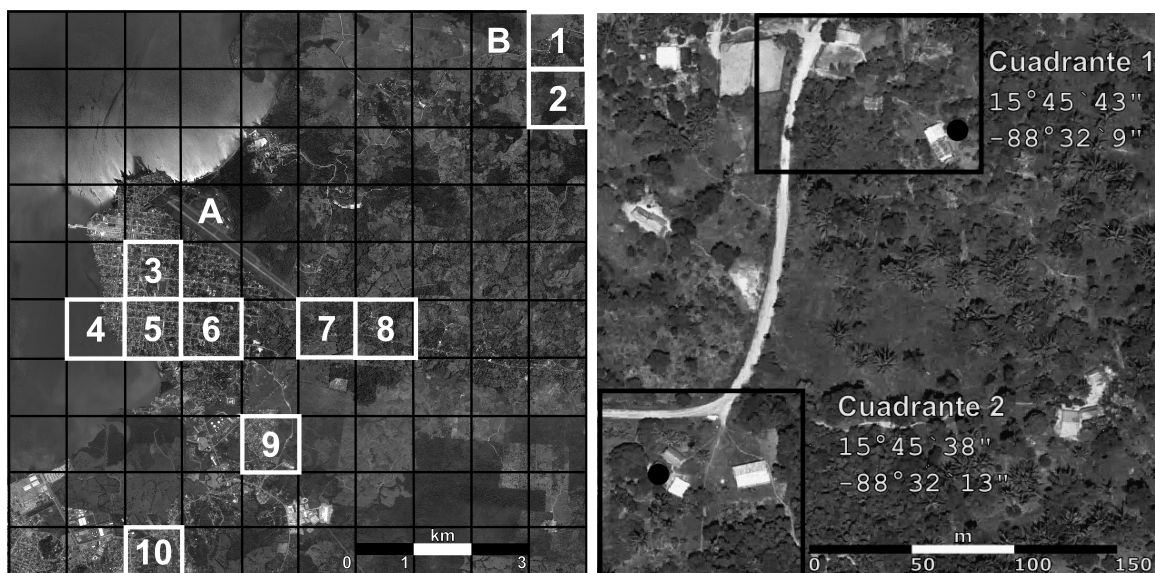
VI. MARCO METODOLÓGICO

A. Procedimiento

Este estudio se realizó como parte de un proyecto a cargo del Laboratorio de Arbovirus y Virus Zoonóticos, del Centro de Estudios en Salud del Instituto de Investigaciones de la Universidad del Valle de Guatemala (CES-UVG). Las actividades relacionadas con este trabajo están documentadas como Procedimientos de Operación Estándar (POEs). Estos documentos son de uso rutinario del laboratorio y se han generado a partir de la literatura publicada. Debido a que la Secretaría Nacional de Ciencia y Tecnología (SENACYT) posee los derechos sobre el proyecto FODECYT 34-2008 el documento de tesis y los POEs fueron publicados con previa autorización. A continuación se describe las actividades que se realizaron durante este estudio.

1. Muestreo. El trabajo realizado fue un estudio retrospectivo en zancudos capturados previamente. Estos zancudos fueron capturados como parte del estudio de vigilancia ecológica del *West Nile virus*, en el CES-UVG/CDC-CAP. Las capturas mencionadas se realizaron durante el período de los años 2007-2009 en Puerto Barrios, Izabal. Para realizar el trabajo se utilizó zancudos previamente capturados, identificados como *Culex (Melaconion) taeniopus*.

a. Sitio de estudio. Los sitios de estudio ($15^{\circ}45'38.64''$, $-88^{\circ}32'13.63''$ y $15^{\circ}45'43.62''$, $-88^{\circ}32'9.82''$) están localizados en el municipio de Puerto Barrios, departamento de Izabal, Guatemala. Los sitios se encuentran a aproximadamente 4 km, en línea recta, de la ciudad de Puerto Barrios (Figura 6, en la página 18). Estos sitios han sido descritos previamente como hábitats rurales (Monzón 2007).

Figura 6: Sitios de estudio.

En el panel de la izquierda se observa una ortofoto compuesta del municipio de Puerto Barrios, Izabal. Los cuadrantes 1 y 2 son considerados hábitats rurales. En el panel de la derecha se observa una ortofoto de una porción de los cuadrantes 1 y 2. El punto negro indica el sitio aproximado en que se colocaba las trampas. Fuente: Ortofotos obtenidas del servidor de datos geográficos de SINIT, <http://ide.segeplan.gob.gt>. Datos originales de MAGA, 2006.

b. Métodos de colecta e identificación. Se trabajó con zancudos *Cx. taeniopus* colectados mensualmente en los sitios de estudio, durante el período de 2007-2009. Para colectar los zancudos se utilizó trampas CDC de luz (John W. Hock Co. Gainesville, FL, USA) y trampas grávidas (Reiter 1983). Durante cada colecta se utilizó una trampa CDC y una trampa grávida por sitio. Para la trampa CDC se utilizó CO₂ a partir de hielo seco como atrayente para los zancudos. Para la trampa grávida se utilizó estiércol de vaca y agua como atrayente. Las colectas se realizaron durante la noche. Por la mañana se extrajo los contenidos de la trampa y se separó los zancudos culicoides de los demás insectos. Se almacenó los zancudos en hielo seco, separados según fecha, sitio de colecta y tipo de trampa utilizada. Se transportó los zancudos al laboratorio en la UVG. En el laboratorio se almacenó los zancudos a -70 °C hasta su identificación.

La identificación de los zancudos colectados fue realizada por entomólogas especializadas. Los zancudos fueron separados por sexo y las hembras identificadas hasta género o especie. La identificación de las hembras se realizó siguiendo sugerencias de una clave previamente publicada (Sallum y Forattini 1996). Utilizando la misma clave se comprobó

la identificación de los especímenes de referencia guardados (ver el Apéndice B, en la página 51). Las hembras fueron separadas en grávidas (cargadas de huevos), alimentadas, y no-alimentadas (vacías). Se organizó las hembras en grupos (lotes) de 50 individuos máximo, según las características mencionadas. Cada lote de zancudos hembra está constituido por individuos de la misma especie que provienen de la misma colecta (fecha, sitio de colecta y tipo de trampa) y están alimentadas, o están vacías o grávidas.

2. Procesamiento de zancudos colectados. Los zancudos utilizados fueron procesados hasta el macerado (ver más adelante) según los procedimientos rutinarios del laboratorio documentados como POE. Los zancudos macerados fueron almacenados a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta la extracción del ARN.

a. Macerado de zancudos. Se maceró los zancudos según el procedimiento documentado del laboratorio, basado en un procedimiento proporcionada por la Dra. B.W. Johnson (CDC, Fort Collins, datos no publicados). Brevemente, cada lote fue suspendido en solución amortiguadora (*buffer*) BA-1 (Medio 199 – Sales de Hank 1X con L-Glutamina, Tris-HCl 0.05 M pH 7.5, albúmina sérica bovina 1% pH 7.0, L-Glutamina 2 mM, NaHCO_3 0.35 g/L, penicilina 100 u/mL, estreptomycin 100 $\mu\text{g/L}$ y anfotericina B 1 $\mu\text{g/mL}$. Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO). Este *buffer* contiene suplementos y antibióticos, y es utilizado para preservar el virus (Lanciotti *et al.* 2000). Se agregó un balón de cobre estéril y se maceró en un macerador eléctrico (Retsch. Newton, PA) modelo MM 301, a 25 rpm por 4 minutos. Se centrifugó por 12 min a 2 750 g y $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Se preparó dos alícuotas de cada lote macerado y se almacenó a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$.

b. Extracción de ARN viral. Se extrajo el ARN de los lotes macerados de *Cx. taeniopus* utilizando el kit QIAamp Viral RNA mini® (QIAGEN. Valencia, CA) o el kit High Pure Viral RNA® (Roche Diagnostics GmbH. Mannheim, Alemania). Para ambas metodologías se usó el procedimiento propuesto por el fabricante. El kit QIAamp es utilizado rutinariamente en el laboratorio para la extracción de ARN viral. La efectividad del kit QIAamp ha sido comprobada previamente (Lanciotti *et al.* 2000). Se confirmó la efectividad del kit Roche comparando la integridad del ARN extraído con ambas metodologías (ver el inciso c, en la página 23). Para esto se extrajo ARN de un

mismo lote macerado de zancudos hembra del género *Culex* utilizando ambas metodologías. El ARN extraído fue evaluado mediante el ensayo de integridad de ARN extraído.

3. Pruebas de laboratorio

a. Preparación de los controles positivos. Se obtuvieron controles positivos con ARN genómico de diferentes bunyavirus. Estos controles fueron proporcionados por Amy Lambert y B.W. Johnson de la *Division of Vector-Borne Infectious Diseases (DVBID), Centers for Disease Control and Prevention (CDC)*, del gobierno de los Estados Unidos de América. Los controles fueron obtenidos en forma de virus inactivo, lisado con la solución de lisis viral del kit QIAamp.

A partir de cada lisado viral obtenido se extrajo ARN utilizando el kit QIAamp y el procedimiento especificado para ese kit, con algunas modificaciones. Brevemente, se utilizó 350 μL del lisado viral para extraer ARN a partir del paso inicial con columnas de extracción. Se realizó el resto del protocolo especificado. Se eluyó dos veces la columna. La primera vez se utilizó 125 μL de *buffer* AVE. La segunda vez se utilizó 50 μL de AVE. Los extractos fueron almacenados a -70°C en tubos de 1.5 mL libres de ARNasas. Se preparó diluciones de 1/100, 1/250, 1/500 y 1/1000 de cada extracto para determinar la concentración adecuada de los controles para las reacciones de RT-PCR.

b. Amplificación y detección del genoma viral. Se utilizó dos ensayos de RT-PCR para detectar el ARN viral extraído de los grupos de zancudos analizados. Un ensayo se consideró exitoso si: a) no hubo amplificación en los controles negativos y b) hubo amplificación del tamaño esperado en los controles positivos. Para cada ensayo exitoso, una muestra fue considerada positiva si se observó amplificación del tamaño esperado. Las muestras que presentaron amplificación no específica fueron consideradas dudosas y se analizaron otra vez. El ensayo para detectar ortobunyavirus del serogrupo California/Bunyamwera demostró un límite de detección de entre 0.1 y 660 unidades formadoras de placa por mL (Lambert y Lanciotti 2009).

1) Estandarización de los ensayos de RT-PCR para amplificación del ARN viral

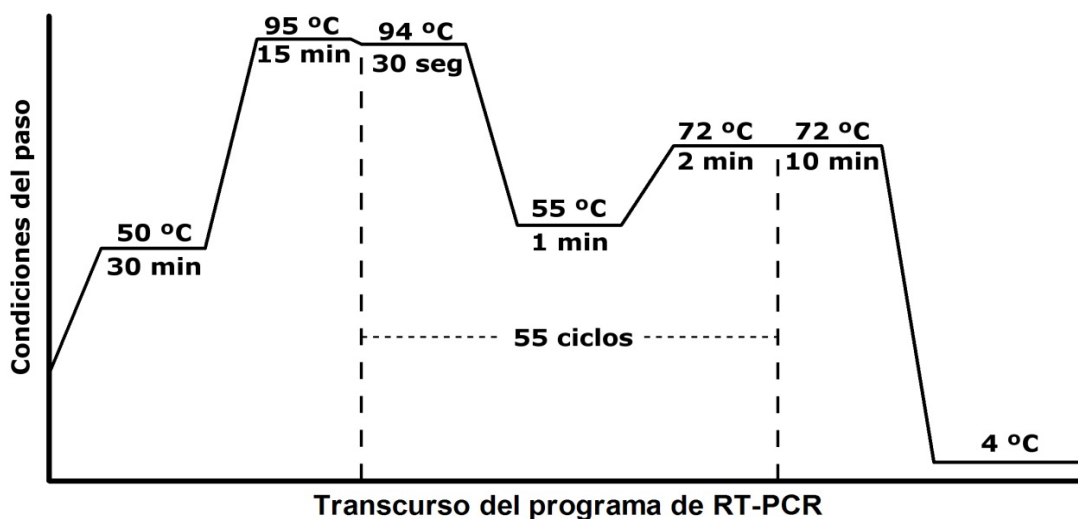
a) Ensayo de RT-PCR con cebadores específicos para ortobunyavirus del serogrupo California/Bunyamwera (Cal/Bwa). Se implementó un ensayo para amplificar ARN de ortobunyavirus en base a un protocolo de amplificación de con-

sensu molecular de bunyavirus (Lambert y Lanciotti 2009), proporcionado por colaboradores del DVVID. Para las reacciones se utilizó el kit QuantiTect SYBR Green RT-PCR (QIAGEN, Valencia, CA). Brevemente, se analizó diluciones 1/100, 1/250, 1/500 y 1/1000 del ARN de control positivo siguiendo exactamente el protocolo mencionado. Se realizó modificaciones al protocolo y se verificó cada vez su funcionamiento. Se analizó cada muestra mediante el protocolo optimizado, en una reacción de 20 μ L utilizando los cebadores Cal/Bwa group forward (5'-GCA AAT GGA TTT GAT CCT GAT GCA G-3') y Cal/Bwa group reverse (5'-TTG TTC CTG TTT GCT GGA AAA TGA T-3'), publicados previamente (Lambert y Lanciotti 2009). La composición de las mezclas de reacción fue: 5 μ L de extracto de ARN, 1 μ M cada cebador (par Cal/Bwa), 1X cada *buffer* del kit y agua libre de ARNasas suficiente para alcanzar un volumen de 20 μ L. Las mezclas de reacción fueron analizadas mediante un RT-PCR de un paso. El programa de amplificación incluyó un ciclo de transcripción reversa a 50 °C por 30 min y a 95 °C por 15 min, seguido de 55 ciclos de desnaturalización a 94°C por 30s, hibridización a 55 °C por 1 min y extensión a 72°C por 2 min, seguidos de 10 min de extensión final a 72 °C. El tamaño esperado del producto será de 210 pb. La Figura 7 en la página 22 muestra un esquema sencillo del programa utilizado.

b) Ensayo con cebador BunC para amplificación de la secuencia completa del segmento S. Se implementó un ensayo para amplificar la secuencia completa del segmento S del ARN genómico de ortobunyavirus (Nunes *et al.* 2005). Para las reacciones se utilizó el kit QuantiTect SYBR Green RT-PCR. Brevemente, se analizó diluciones 1/100, 1/250, 1/500 y 1/1000 del ARN de control positivo siguiendo exactamente el protocolo mencionado. Se realizó modificaciones al protocolo y se verificó cada vez su funcionamiento. Se analizó cada muestra mediante el protocolo optimizado, en una reacción de 20 μ L utilizando el cebador BunC (5'-AGT AGT GTG CTC CAC-3'), publicado previamente (Nunes *et al.* 2005). La composición de las mezclas de reacción fue: 5 μ L de extracto de ARN, 2 μ M cebador (BunC), 1X cada *buffer* del kit y agua libre de ARNasas suficiente para alcanzar un volumen de 20 μ L. Las mezclas de reacción fueron analizadas mediante un RT-PCR de un paso. Se utilizó el mismo programa de amplificación que en el ensayo con el par de cebadores Cal/Bwa. El tamaño del producto para este ensayo depende del virus presente. El prototipo del género *Orthobunyavirus*, el

Bunyamwera virus, tiene un genoma de ~961 bases (Schmaljohn y Hooper 2001). En este género se observa muchos virus con segmentos S de ~900-1000 bases (Nunes *et al.* 2005), por lo que ese será el tamaño esperado del producto.

Figura 7: Esquema del programa de RT-PCR utilizado para amplificar ARN de ortobunyavirus.



2) Amplificación del ARN viral por RT PCR. Se utilizó el ensayo de RT-PCR optimizado con los cebadores Cal/Bwa para analizar el ARN extraído de los grupos de zancudos. Las reacciones fueron realizadas en un termociclador ATC-402 o ATC-201 (NyxTechnik, San Diego, CA). Los productos de amplificación obtenidos fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa. Las muestras positivas para el RT-PCR con los cebadores específicos para ortobunyavirus fueron analizadas con el ensayo RT-PCR con el cebador BunC, para intentar amplificar la secuencia completa del segmento S. Los productos de amplificación obtenidos fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa.

3) Análisis de los productos de amplificación por electroforesis. Los productos de amplificación de cada ensayo fueron separados por electroforesis en gel de agarosa al 2% y visualizados mediante tinción con bromuro de etidio. Brevemente, se preparó un gel de agarosa al 2% en *buffer* TBE 1X (89 mM Tris, 89 mM borato, 1 mM EDTA).

Premixed Dry Pack Buffer, Mercury, CLP. San Diego, CA). A la agarosa líquida se agregó ~50 uL de bromuro de etidio 10 mg/mL. Cada producto de amplificación fue mezclado con un *buffer* de carga 6X (Blue-Orange Loading Dye, Promega. Madison, WI). Se cargó 10 µL de la mezcla en los pozos del gel de agarosa. Se cargó un pozo con marcador molecular de 100 pb como referencia (BenchTop 100 bp Molecular Ladder, Promega. Madison, WI). La electroforesis fue realizada en una cámara de electroforesis RunOne (Embitec. San Diego, CA) a 50 V por 1 hora y 30 minutos. Se visualizó las bandas de producto en una cámara con transiluminador de luz ultravioleta (BioDocIt, UVP. Upland, CA).

c. Control interno de extracción de ARN. Se comprobó la eficiencia de la extracción de ARN con un ensayo diseñado para detectar el ARN ribosomal 18S de zancudos de los géneros *Aedes* y *Culex* (Hoffmann *et al.* 2004). Esta prueba se basa en la detección de la alta cantidad de copias de este ARN y su secuencia conservada: si se extrajo ARN correctamente, el ensayo debe ser positivo. Brevemente, se analizó cada muestra en reacciones de RT-PCR de 40 µL. Los cebadores que se utilizaron para esta reacción fueron 18S417 (5' -ACG GGG AGG TAG TGA CGA GAA ATA-3') y 18S920c (5' -TAA TAC TAA TGC CCC CAA CTA CTT-3'), publicados previamente (Hoffmann *et al.* 2004). La composición de cada reacción fue: 16 µL de extracto de ARN, 1 µM de cada cebador, 1X cada *buffer* del kit y agua libre de ARNasas suficiente para alcanzar un volumen de 40 µL. Se utilizó agua libre de ARNasas como control negativo. El programa de amplificación incluyó un ciclo de transcripción reversa a 45 °C por 1 hora y a 94 °C por 3 min, seguido de 45 ciclos de desnaturalización a 94 °C por 30s, hibridización a 60 °C por 1 min y extensión a 68 °C por 3 min, seguidos de 7 min de extensión final a 72 °C. Los productos de amplificación obtenidos fueron visualizados por electroforesis en gel de agarosa al 2%. La presencia de un producto de ~500 pb en un ensayo sin amplificación en los controles negativos se consideró como un resultado positivo. Esta prueba fue utilizada para comprobar la extracción de ARN en muestras seleccionadas al azar y la extracción de ARN con el kit Roche.

B. Análisis estadístico

Los análisis estadísticos fueron realizados con el programa y lenguaje estadístico R (v. 2.10.1, R Development Core Team 2009). Los datos crudos fueron organizados en el programa Excel, del paquete Microsoft Office 2003 ó 2007 (Microsoft Corporation, Redmond, WA). Los datos organizados fueron importados a R para su análisis. El nivel de significancia para todas las pruebas realizadas fue de $\alpha = 0.05$.

Para analizar la tasa de infección por bunyavirus en los zancudos analizados se utilizó un método de estimación de máxima verosimilitud (MLE, por sus siglas en inglés) desarrollado en el departamento de Bioestadística de la *University of Alabama at Birmingham*. Este método está basado en la estimación de la probabilidad de infección de un solo zancudo en base a los resultados *negativos* del tamizaje molecular (Barker 2000, Katholi y Unnasch 2006). Para analizar los datos se utilizó el programa Poolscreen (Katholi *et al.* 1995) v.2, proporcionado por C.R. Katholi. Este programa está disponible a solicitud en el *Department of Biostatistics, School of Medical Sciences, UAB*.

Se realizó una prueba de hipótesis a partir de un método sugerido por C.R. Katholi en base a la metodología de colecta y la estructura de los grupos de zancudos colectados (C.R. Katholi, comunicación personal). El estadístico de prueba se calcula mediante una prueba de punteo (*Score test*). Se utilizó como tasa de infección alternativa $p_a = 0.005$. Otros parámetros utilizados en el análisis fueron el total de lotes analizados (114), la cantidad máxima de zancudos por lote (50), el total de zancudos (2942) y la distribución real del tamaño de los lotes analizados (la cantidad de zancudos en cada lote analizado).

VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

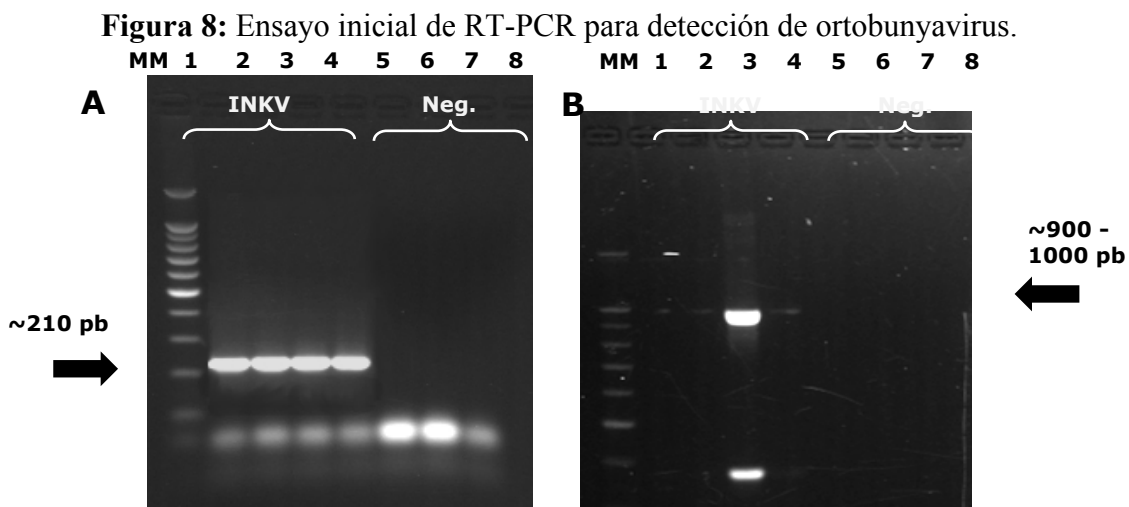
A. Detección de ortobunyavirus en zancudos

Para estimar la tasa de infección por ortobunyavirus en zancudos hembra *Cx. taeniopus* se estandarizó dos ensayos de RT-PCR de detección de punto final (convencional). El ensayo Cal/Bwa (Metodología, en la página 20) amplifica específicamente una región del segmento S de ortobunyavirus del serogrupo California/Bunyamwera, que corresponde al gen que codifica la proteína no estructural (NS). La región amplificada tiene un tamaño de aproximadamente 210 pb. El tamaño exacto del producto de amplificación depende de la especie de ortobunyavirus detectada, y comprende un rango de 210 a 300 pb (Lambert y Lanciotti 2009). El ensayo BunC se basa en el uso de un cebador complementario a los extremos conservados de los tres segmentos genómicos de los bunyavirus del género *Orthobunyavirus* (Nunes *et al.* 2005). Debido al tamaño de los segmentos (Schmaljohn y Hooper 2001), solo se puede amplificar fácilmente el segmento S. Los productos de amplificación del ensayo BunC tienen un tamaño aproximada de 900 pb.

Para comprobar el funcionamiento de los ensayos estandarizados se utilizó ARN extraído de *Inkoo virus* (INKV, *Orthobunyavirus*) no viable. INKV es un ortobunyavirus del serogrupo California/Bunyamwera presente únicamente en Europa (Schmaljohn y Hooper 2001). Ya que este virus no circula en América, utilizarlo como control positivo provee la ventaja de un control de calidad: si se observa un resultado positivo a partir de una reacción en que se utilizó como plantilla ARN extraído de una muestra, se puede secuenciar el producto de amplificación. Si la secuencia coincide completamente con la de INKV se puede concluir que el resultado es debido a una contaminación y, por lo tanto, es inválido. Con un genoma de 986 bases, INKV tiene un producto de amplificación de 208 pb para el ensayo Cal/Bwa (bases 112–320). Para el ensayo BunC tiene un producto de amplificación del tamaño del segmento S, 986 pb. En el Apéndice A (pág. 50) se presenta información detallada de la cepa de INKV utilizada como control.

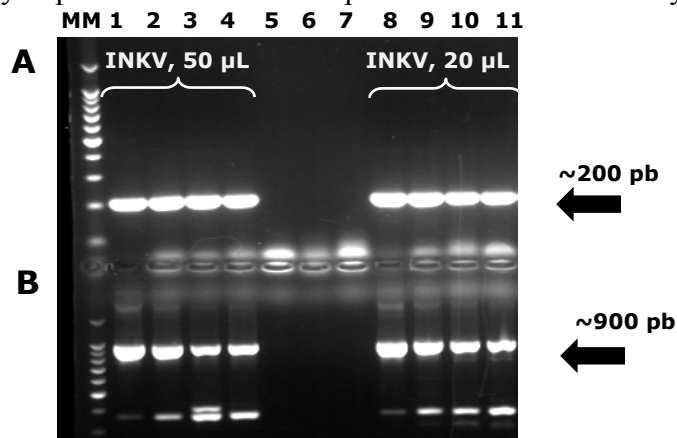
1. Optimización del ensayo de RT-PCR para la detección de ortobunyavirus. Se implementó los ensayos de RT-PCR utilizando condiciones de reacción publicadas previamente (Lambert y Lanciotti 2009). Se modificó la composición de las reacciones del en-

sayo BunC para acoplarlo al ensayo Cal/Bwa con las mismas condiciones de tiempo y temperatura en el programa de termociclado. En la Figura 8 se observan los productos de amplificación de estos ensayos, separados mediante electroforesis en gel de agarosa y visualizados por tinción con bromuro de etidio. Se modificó la composición de la mezcla de reacción de cada ensayo para disminuir el volumen total. En la Figura 8 se observa los resultados de la implementación.



En el panel A se observa los productos del ensayo Cal/Bwa. En el panel B se observa los productos del ensayo BunC. Los carriles 1-4 son diluciones 1/100, 1/250, 1/500 y 1/1000 del control de INKV. Los carriles 5-8 son controles negativos duplicados, de agua y sin plantilla.

Figura 9: Ensayo optimizado de RT-PCR para detección de ortobunyavirus.



En los paneles A y B se observa los productos de amplificación de los ensayos Cal/Bwa y BunC, respectivamente. Se utilizó diluciones 1/100, 1/250, 1/500 y 1/1000 del ARN extraído del control de INKV. Los carriles 1-4 corresponden a reacciones de 50 µL con diluciones de INKV como plantilla, los carriles 8-11 a reacciones de 20 µL. Los carriles 5 y 7 son controles negativos para las reacciones de 50 y 20 µL.

2. Detección de ortobunyavirus en *Cx. taeniopus*. Para detectar el ARN genómico de ortobunyavirus en ácidos nucleicos se utilizó las pruebas estandarizadas. Un ensayo se consideró positivo si se observaba un producto de amplificación de la longitud esperada. Se trabajó con ARN extraído de dos tipos de muestra: lote de zancudos no-alimentados y zancudos alimentados individuales. Para considerar positiva una muestra se requirió que ambos ensayos (Cal/Bwa y BunC) tuvieran un resultado positivo. Se observó que el ensayo BunC amplificaba inespecíficamente ácidos nucleicos, generando productos de amplificación de muchos tamaños (datos no mostrados). Ya que este ensayo utiliza un solo cebador corto (15 b), es posible que se una inespecíficamente en ácidos nucleicos con secuencias similares. Debido a esto, se optó por considerar presuntamente positiva una muestra con amplificación del tamaño esperado para el ensayo Cal/Bwa. En la Figura 10 se observa un ejemplo del ensayo Cal/Bwa.

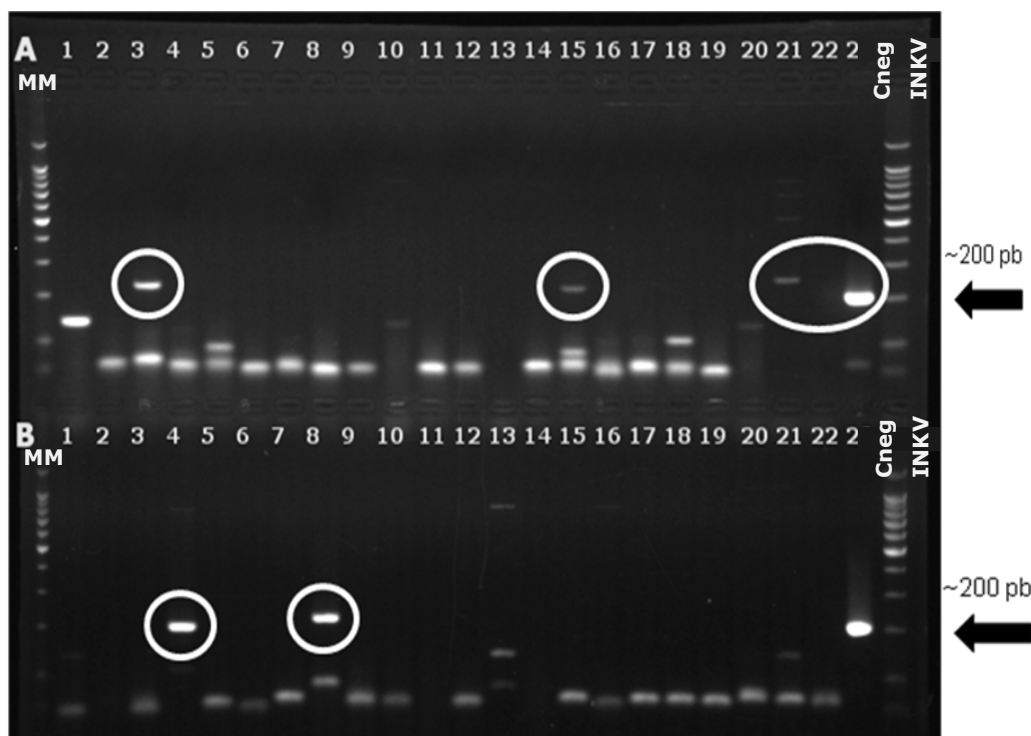
B. Tasa de infección por bunyavirus en *Cx. taeniopus*

La vigilancia de arbovirus en sus posibles vectores se basa en la captura sistemática de artrópodos y el análisis de los mismos para detectar el virus. Recientemente la vigilancia en artrópodos se ha utilizado como una herramienta para prevenir o intervenir en brotes de arbovirus transmitidos por zancudos (Gu *et al.* 2004, Condotta *et al.* 2004). Generalmente la tasa de infección por un arbovirus en la población de vectores es baja, pero en las condiciones adecuadas la transmisión puede aumentar y la tasa de infección en los vectores puede alcanzar rápidamente niveles altos (Gu *et al.* 2008). Esto puede resultar en eventos que afecten la salud humana o animal (Gu y Novak 2004, Vitek *et al.* 2009).

En ausencia de altos niveles de transmisión, es necesario analizar un gran número de zancudos para poder estimar adecuadamente la tasa de infección por el patógeno en los vectores (Gu *et al.* 2004, Katholi y Unnasch 2006). Debido al costo y dificultad de analizar muchos zancudos individuales, generalmente se recurre al análisis de lotes de zancudos. Estos lotes están conformados por individuos que comparten características de interés. Entre estas características se considera principalmente la especie, ya que es importante identificar las especies vector (Condotta *et al.* 2004). También es necesario

considerar el sitio y el período de captura, ya que al agregar múltiples sitios y períodos en el análisis se pierde información de la transmisión focal de arbovirus (Gu *et al.* 2008). Debido a limitaciones técnicas (Vitek *et al.* 2009) y analíticas (Katholi y Unnasch 2006), los lotes están limitados a contener un máximo de individuos, típicamente menor a 100. Por esto, los lotes generalmente tienen un tamaño variable entre 1 y 50 zancudos (Katholi y Unnasch 2006).

Figura 10: Fotografía de los productos de amplificación del RT-PCR Cal/Bwa para detección de ortobunyavirus.



En ambos paneles (A yB) los extremos izquierdo y derecho son marcadores moleculares de ADN de doble hebra con masa molecular a intervalos de 100 pb. Los carriles 1-21 contienen productos de amplificación de reacciones con muestra. El carril 22 contiene control negativo de agua y el carril 23 contiene control positivo de INKV. Las bandas de amplificación del tamaño esperado se muestran rodeadas por un círculo blanco.

La proporción de zancudos infectados en un período de tiempo es comúnmente estimada como la tasa mínima de infección (MIR, por sus siglas en inglés). Este estimado se basa en la suposición de que al menos un zancudo está infectado en cada lote positivo.

Ya que no es posible saber si más de un zancudo del lote estaba infectado, calcular la MIR puede subestimar el nivel real de infección (Gu 2003, Katholi y Unnasch 2006). Una alternativa para estimar la tasa de infección es el método del estimador de máxima verosimilitud (MLE, por sus siglas en inglés).

En el método MLE se asume que la prueba de detección es perfectamente sensible y específica (*i.e.* siempre que hay infección ésta es detectada, y nunca se detecta si no la hay), que cada zancudo es independiente de los demás (*i.e.* todos tienen la misma probabilidad de estar infectados), y que todos los lotes están distribuidos idénticamente (*i.e.* agrupar los zancudos no afecta la probabilidad de que estén infectados). Asumiendo esto, aunque no se puede saber si hay más de un individuo infectado en un lote positivo, se puede asegurar que no hay individuos infectados en los lotes negativos. Tomando en cuenta los lotes negativos y la cantidad de zancudos que contienen, es posible estimar la probabilidad de que un solo zancudo esté infectado en la población (Barker 2000).

Para estimar la tasa de infección por ortobunyavirus en *Cx. taeniopus* se calculó la MIR y el MLE a partir de los resultados del tamizaje molecular realizado con el ensayo optimizado. Cada lote contenía como máximo 50 zancudos. En total, se analizó 114 lotes de zancudos, que contenían 2942 *Cx. taeniopus* hembra. Las hembras no-alimentadas se procesaron por lotes. Las hembras alimentadas fueron analizadas individualmente en otro trabajo de tesis (Ramírez 2010) para determinar la fuente de la ingesta sanguínea. Por esto, las hembras alimentadas se procesaron individualmente en este estudio. El Cuadro 1 muestra los datos de cada lote de *Cx. taeniopus* positivo para ortobunyavirus. Se observa que, excepto el lote GU-2007-09991, los lotes positivos de zancudos no-alimentados contienen el máximo posible de zancudos. Ya que mientras más zancudos hay en el lote, más posible es encontrar uno positivo, se espera que para tasas de infección bajas la mayoría de lotes positivos contenga un número grande de zancudos.

En contraste con los lotes positivos de *Cx. taeniopus* no-alimentadas, en el Cuadro 1 se observa que los lotes positivos de zancudos alimentados contienen tanto cantidades grandes como pequeñas de zancudos. Esto se espera cuando hay tasas de infección altas, ya que la probabilidad de encontrar al menos un zancudo infectado en un lote con pocos

zancudos es similar a la de encontrar varios zancudos infectados en un lote mayor. Como se mencionó en la metodología, las *Cx. taeniopus* alimentadas fueron analizadas individualmente. Esto se realizó como parte del estudio de arbovirus en *Cx. taeniopus* mencionado anteriormente, para poder analizar la relación entre la detección de ARN de bunyavirus en un zancudo alimentado y la fuente de su ingesta sanguínea. Debido a los resultados para zancudos alimentados individuales es posible observar que en varios casos hay más de un zancudo infectado por lote, a pesar de que estos contienen pocos zancudos. Esto refuerza la explicación de que lo observado se debe a una tasa de infección alta. Debido a que la prueba de hipótesis desarrollada se basa en el resultado por lote, se asignó un resultado positivo a los lotes con al menos una hembra positiva para ortobunyavirus. A los lotes sin hembras positivas por RT-PCR se asignó un resultado negativo.

Cuadro 1. Lotes de *Cx. taeniopus* no-alimentadas y alimentadas, positivos para ortobunyavirus por RT-PCR. Se trabajó un total de 81 lotes de zancudos no-alimentados, que contenían 2721 zancudos. Se trabajó un total de 33 lotes de zancudos alimentados, que contenían 221 zancudos.

ID Lote	Fecha colecta (año-mes-día)	Cuadrante	No. de zancudos por lote	Individuos positivos	Trampa
NA1*	2007-8-1	1	50	nd***	CDC
NA2	2007-8-29	2	50	nd	CDC
NA3	2007-8-29	1	50	nd	CDC
NA4	2007-8-29	1	50	nd	CDC
NA5	2007-9-19	1	7	nd	CDC
NA6	2007-11-8	1	50	nd	CDC
AL1**	2007-1-12	1	1	1	CDC
AL2	2007-8-29	2	12	2	CDC
AL3	2007-11-8	2	50	10	CDC
AL4	2007-11-29	2	15	3	CDC
AL5	2008-1-30	1	2	1	Grávida
AL6	2008-2-19	2	12	1	CDC
AL7	2008-3-12	2	9	4	CDC
AL8	2008-6-5	1	9	1	CDC
AL9	2008-7-16	1	14	2	CDC

*, zancudos no-alimentados;

** , zancudos alimentados;

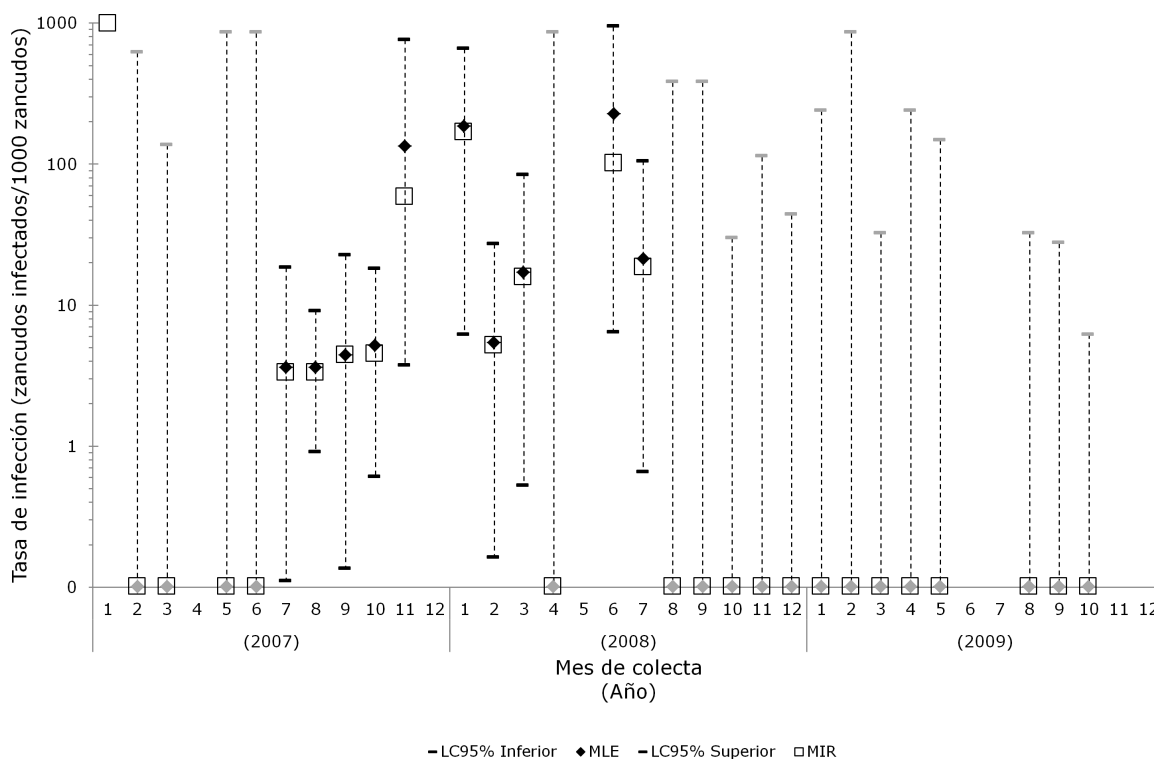
***, no determinado.

Con los datos anteriores se calculó la tasa mínima de infección (MIR) y se estimó la tasa de infección por el método MLE para las *Cx. taeniopus* alimentadas y no-alimentadas. Se determinó mediante una prueba de Mann-Whitney que hay una diferencia significativa entre las tasas de infección de cada grupo ($p = 0.0061$, $\alpha = 0.05$, datos no mostrados), con una tasa de infección en zancudos alimentados con proporción ~ 25 veces mayor a la tasa de infección en zancudos no-alimentados. Se ha observado que los vectores competentes de bunyavirus presentan muchas veces la capacidad de transmisión vertical del virus a su descendencia (Borucki *et al.* 2002). Si una hembra no-alimentada está infectada con un bunyavirus, es posible que el virus haya sido transmitido verticalmente. Ya que la tasa de infección es significativamente mayor en zancudos alimentados, podría suponerse que la presencia de un bunyavirus es debida a la ingesta de sangre infectada. Esto sugiere que la población de *Cx. taeniopus* analizada se alimentaba de vertebrados susceptibles a la infección por ortobunyavirus, lo que podría ser un factor importante para la adecuación de *Cx. taeniopus* como un posible vector de los ortobunyavirus en los sitios de estudio.

Para estimar la tasa de infección de la población de *Cx. taeniopus* estudiada, se calculó la MIR y se estimó la tasa de infección por el método MLE con los datos de todos los lotes de zancudos. En la Gráfica 1, en la página 32, se observa la tasa de infección mensual estimada por ambos métodos. Para la estimación de MLE se incluye los límites de confianza al 95% (LC95%). El eje vertical se muestra en escala logarítmica de base 10 para poder evaluar las tasas de infección bajas y altas.

La tasa de infección de enero 2007 no pudo ser calculada por el método MLE, ya que no se puede resolver el estimador si todos los lotes son positivos (C.R. Katholi, comunicación personal). En este caso un único lote, con un solo zancudo alimentado, resultó positivo. Debido a eso, la estimación por MIR es el máximo posible (1000 zancudos infectados por cada 1000 zancudos, es decir una tasa de infección del 100%). Aunque es posible que la tasa de infección en ese mes sea muy alta, ya que el único zancudo de esa captura resultó positivo, no se puede confiar en esa estimación porque el tamaño de la muestra no cumple con los requisitos mínimos para el estimador MIR (Condotta *et al.* 2004).

Gráfica 1. Tasas de infección (MLE y MIR) por bunyavirus en *Cx. taeniopus*, 2007-2009. *, significativo por prueba de punteo, $\alpha = 0.05$, $p_a = 0.005$



Los límites de confianza para el MLE son un reflejo del sesgo del estimador (Katholi y Unnasch 2006). Es decir, mientras mayor sea el rango de confianza menos exacto es el estimado. Debido a que la cantidad de lotes por cada mes es baja, los estimados de tasa de infección cero (*e.g.* febrero 2007) tienen límites de confianza muy amplios. Esto es porque con la cantidad de información disponible (*i.e.* solamente lotes negativos) no es posible asegurar que la tasa de infección sea realmente cero.

Se puede observar que la tasa de infección estimada por ambos métodos es similar. Se determinó mediante una prueba de Mann-Whitney que no hay una diferencia significativa entre las tasas de infección calculadas por cada método ($p = 0.5787$, $\alpha = 0.05$). Esto sugiere que la tasa de infección estimada es cercana a la tasa de infección real, ya que MIR estima la tasa mínima de infección posible con los resultados obtenidos.

C. Prueba de hipótesis

El análisis de datos de tasa de infección por patógenos en sus vectores típicamente no incluye una hipótesis. Esto se debe a la dificultad del análisis de hipótesis con los datos obtenidos generalmente en los estudios de tasas de infección (Katholi *et al.* 2009). Para analizar la hipótesis se modificó una metodología publicada previamente (Gao *et al.* 2009).

Este método está basado en una simulación por computadora que construye zonas de rechazo de hipótesis en base a la estructura de los datos del estudio (Katholi 2006, Gao *et al.* 2009). Para esto, se modificó el protocolo propuesto por Gao y colaboradores, para adaptarlo a las características de la muestra analizada en este trabajo. Además, se modificó el protocolo para adaptarlo al lenguaje R y optimizarlo para algoritmos de computación paralela. El método utilizado para probar una hipótesis sobre la tasa de infección p_o de una infección dentro de una población de vectores requiere proponer una tasa de infección alternativa p_a . Ya que se hipotetizó una tasa de infección de $p_o = 0.001$ (1 zancudo infectado por cada 1000 zancudos), se utilizó una tasa de infección alternativa $p_a = 0.005$, cinco veces mayor a la tasa de infección hipotetizada (Gao *et al.* 2009). En el Cuadro 2, más adelante, se muestra las tasas de infección mensuales que son significativamente mayores a 0.001.

Cuadro 2. Resultados de la prueba de hipótesis para la tasa de infección mensual por bunyavirus en *Cx. taeniopus*. Se muestra únicamente las tasas de infección indicadas como significativamente mayores a 1 zancudo infectado por cada 1000 ($\alpha = 0.05$).

Año	Mes	Zancudos Capturados	Lotes		MLE	MIR
			Cantidad	Positivos		
2007	1	1	1	1	---	1000*
	7	301	9	1	3.63	3.32
	8	1198	29	4	3.58	3.34
	9	229	7	1	4.43	4.37
	10	441	13	2	5.13	4.54
2008	1	6	3	1	183.50	166.67
	2	193	6	1	5.34	5.18
	3	63	3	1	16.98	15.87
	6	10	2	1	225.73	100.00
	7	54	5	1	21.21	18.52

* Estimado no es confiable debido a que la muestra contiene un único zancudo y éste es positivo. Ver discusión en la página 31.

Se observa que la tasa de infección por ortobunyavirus en *Cx. taeniopus* es significativamente mayor a 1 zancudo infectado por cada mil. Esto podría indicar que hubo bunyavirus circulando en los sitios de estudio durante 2007-2008. Para que estos resultados tengan mayor validez es necesaria la confirmación de la infección en los zancudos mediante cultivo celular. Además, para poder considerar a *Cx. taeniopus* como un vector de bunyavirus en Guatemala primero es necesario: 1) demostrar la presencia del arbovirus en los zancudos; 2) demostrar la competencia vectorial del zancudo mediante estudios controlados en laboratorio; 3) demostrar que el zancudo se alimenta de posibles hospederos competentes en la naturaleza; y 4) sabiendo lo anterior, demostrar que la abundancia del zancudo es suficiente para la transmisión del virus (H.M. Savage, comunicación personal).

D. Densidad relativa de *Cx. taeniopus*

La tasa de infección por un arbovirus en un posible vector artrópodo es un factor útil para vigilancia del patógeno (Katholi y Unnasch 2006). Pero, para definir mejor la importancia del patógeno como un riesgo es necesario el uso de otros indicadores, como la abundancia del posible vector (Gu *et al.* 2008) o los patrones de alimentación (Cupp *et al.* 1986). La densidad relativa es una medida estandarizada de la cantidad de zancudos que fueron capturados y no está sesgada por el esfuerzo de captura. En la Gráfica 2, en la página 36, se observa la densidad relativa de *Cx. taeniopus* en los sitios de estudio (cuadrantes 1 y 2) y el resto de cuadrantes en Puerto Barrios.

Se observa que la distribución de *Cx. taeniopus* es predominantemente rural. Datos recientes indican que su hábitat principal es el pastizal soleado (Equipo de investigación ArboZoo, CES-UVG, datos no publicados). Esto coincide con descripciones previas del hábitat donde este zancudo se alimenta y reproduce (Cupp *et al.* 1986, Forattini *et al.* 1991).

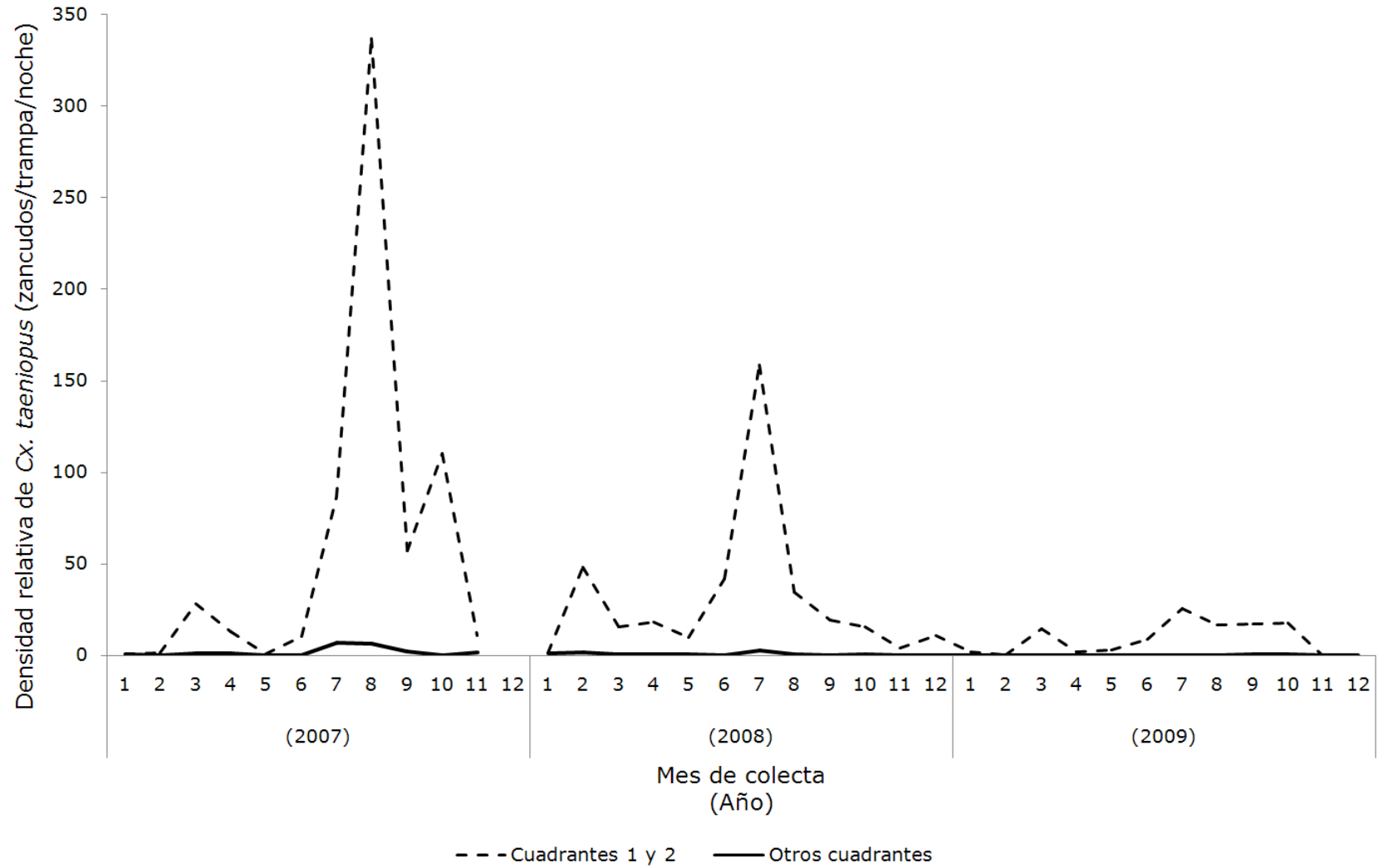
Se observa que la densidad relativa de *Cx. taeniopus* varía con el tiempo. Aparentemente la densidad relativa disminuye anualmente. Mediante un análisis de varianza de Friedman se determinó que sí hay un cambio significativo en la densidad relativa media de *Cx. taeniopus* ($p = 0.0377$, $\alpha = 0.05$). Esta disminución en la densidad de una población de zancudos puede deberse a diversos factores, principalmente ambientales. Por

ejemplo, el desplazamiento del hábitat natural del zancudo por modificaciones intencionales para agricultura o ganadería. Aunque en este caso se observa una disminución en la densidad del zancudo, modificaciones al ambiente pueden desplazar a los artrópodos a nuevas áreas con hospederos susceptibles u otras condiciones favorables para un aumento en la transmisión de algún arbovirus (Vasconcelos *et al.* 2001, Norris 2004, Elliot 2009).

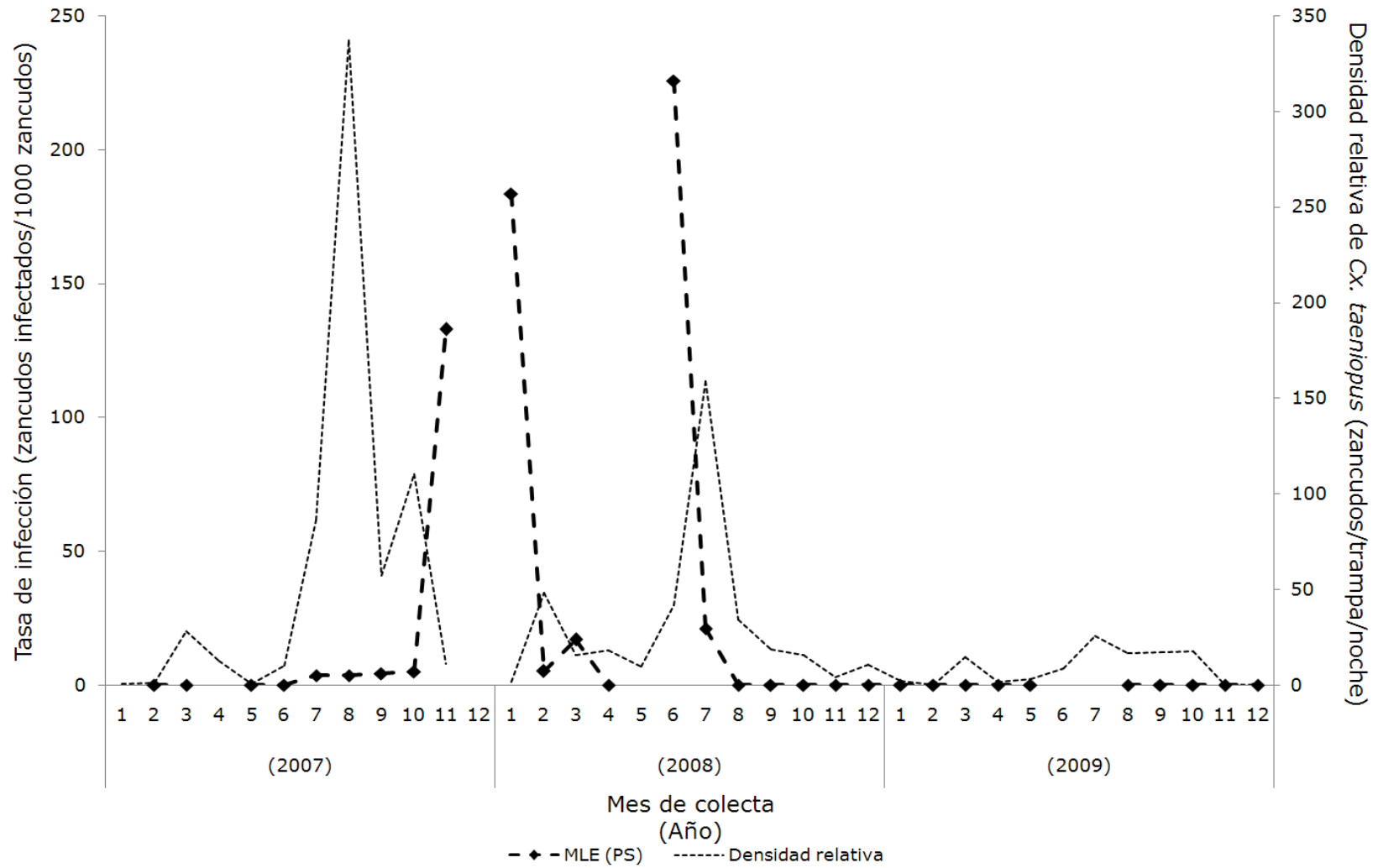
Al comparar la tasa de infección por bunyavirus y la densidad relativa de *Cx. taeniopus* se observa una similitud en los patrones de ambos (Gráfica 3, en la página 37). Mediante un análisis de correlación de Spearman se determinó que si hay correlación entre la densidad relativa y la tasa de infección por bunyavirus en *Cx. taeniopus* ($r = 0.4360$, $p = 0.0204$, $\alpha = 0.05$). La detección de un pico de tasa de infección con un retraso respecto al pico de densidad relativa puede tener varias explicaciones. Podría ser que al haber más zancudos alimentándose, más hospederos vertebrados estén expuestos al virus. Las poblaciones de posibles hospederos cambian poco en períodos cortos de tiempo, por lo que la disminución en la población de posibles vectores aumenta la probabilidad de que un zancudo se alimente de un vertebrado infectado. Esto, a su vez, aumenta la probabilidad de capturar un zancudo infectado.

Es importante tomar en consideración que este trabajo provee estimaciones de la tasa de infección por ortobunyavirus en *Cx. taeniopus* a partir de técnicas moleculares de detección de ácidos nucleicos. Se mencionó en los antecedentes que estas técnicas desplazaron a los métodos tradicionales de detección de virus, incluido el cultivo en células susceptibles para permitir el aislamiento viral. El cultivo celular es la técnica definitiva de detección de una infección viral, ya que toma en cuenta únicamente partículas virales viables. Como las técnicas moleculares pueden tener una alta sensibilidad, es posible que se detecten partículas virales no viables, que podrían haber sido ingeridas por el zancudo aún sin que éste sea un hospedero competente para la replicación del virus. Debido a esto, hay que recurrir a la confirmación por cultivo celular de los resultados positivos. Sin esta confirmación, no puede asegurarse que la presencia de ortobunyavirus en *Cx. taeniopus* tenga alguna relevancia para la transmisión del virus en la naturaleza.

Gráfica 2. Densidades de *Cx. taeniopus*, 2007-2009.



Gráfica 3. Tasa de infección (MLE) por bunyavirus y densidad relativa mensual de *Cx. taeniopus*, 2007-2009



Entonces, son necesarios más estudios para determinar la importancia de *Cx. taeniopus* como un vector de bunyavirus. Este trabajo complementa otros estudios realizados alrededor de *Cx. taeniopus*, que incluyen los patrones de alimentación del zancudo y la presencia de otros arbovirus. Se espera que este trabajo sea de utilidad para quienes desarrollan estrategia de control de vectores y prevención de enfermedades arbovirales. Se ha observado que el control de vectores se realiza principalmente en áreas urbanas (S. Sosa, comunicación personal). Se ha observado que bunyavirus de zonas selváticas o rurales pueden representar un riesgo a la salud humana en asentamientos urbanos, debido posiblemente al aumento del territorio ocupado por las ciudades (Moraes 2007). Estudiar a *Cx. taeniopus* como un posible vector de bunyavirus en zonas rurales podría proporcionar las bases para realizar control de vectores en lugares como los sitios de estudio.

Para justificar este tipo de estudios, también es necesario evaluar la posible importancia de los bunyavirus directamente en la salud humana. Está previsto evaluar las metodologías implementadas en este trabajo como posible herramienta de diagnóstico de enfermedades febriles de etiología no determinada.

VIII. CONCLUSIONES

- A. *Culex (Melanoconion) taeniopus* puede encontrarse infectado por ortobunyavirus en los sitios de estudio.
- B. La densidad relativa de *Cx. taeniopus* disminuyó desde 2007 hasta 2009.
- C. Existe una correlación entre la densidad relativa de *Cx. taeniopus* y la tasa de infección por bunyavirus en los mismos.
- D. La tasa de infección por bunyavirus en *Cx. taeniopus* es significativamente mayor a 1 zancudo infectado por cada 1000.

IX. RECOMENDACIONES

- A. Se recomienda analizar *Cx. taeniopus* capturados en otros sitios para investigar la posible infección con bunyavirus.
- B. Verificar el funcionamiento del ensayo de detección de ortobunyavirus utilizando varios bunyavirus de identidad conocida.
- C. Realizar estudios de competencia vectorial de *Cx. taeniopus* con bunyavirus.
- D. Extender los estudios de patrones de ingesta sanguínea para identificar posibles hospederos de bunyavirus en la naturaleza.
- E. Continuar con estudios sobre la biología de *Cx. taeniopus* para definir su importancia como posible vector de bunyavirus u otros arbovirus.

X. BIBLIOGRAFÍA

En esta sección se presenta las fuentes de información utilizadas en la elaboración de este trabajo. Las entradas de la bibliografía recomendadas como lectura adicional están marcadas con una doble-daga (§) en el margen izquierdo.

- Barker, J.T. 2000. «Statistical estimators of infection potential based on PCR pool screening with unequal pool sizes». Tesis Doctoral del Department of Biostatistics, School of Medical Sciences, The University of Alabama at Birmingham. 77 págs. Documento propiedad de UAB proporcionado por C.R. Katholi.
- Barr, J.N.; J.W. Rodgers y G.W. Wertz. 2005. «The *Bunyamwera virus* mRNA Transcription Signal Resides within both the 3' and the 5' Terminal Regions and Allows Ambisense Transcription from a Model RNA Segment». *Journal of Virology*. 79(19):12602–12607.
- Barr, J.N. y G.W. Wertz. 2005. «Role of the Conserved Nucleotide Mismatch within 3'- and 5'-Terminal Regions of *Bunyamwera virus* in Signaling Transcription» *Journal of Virology*. 79(6):3586–3594.
- Borucki, M.K.; B.J. Kempf, B.J. Blitvich, C.D. Blair y B.J. Beaty. 2002. «*La Crosse virus*: replication in vertebrate and invertebrate hosts». *Microbes and infection*. 4:341–350.
- Condotta, S.A.; F.F. Hunter y M.J. Bidochka. 2004. «*West Nile virus* Infection Rates in Pooled and Individual Mosquito Samples». *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*. 4(3):198–203.

- Cupp, E.W.; R.D. Kreutzer y S.C. Weaver. 1989. «The Biosystematics of *Culex (Melanoconion) taeniopus sensu lato* in relation to Venezuelan Equine Encephalomyelitis». *Mosquito Systematics*. 21(3):216–221.
- Cupp, E.W.; W.F. Scherer, J.B. Lok, R.J. Brenner, G.M. Dziem and J.V. Ordonez. 1986. «Entomological studies at an enzootic *Venezuelan Equine Encephalitis Virus* focus in Guatemala, 1977-1980». *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 35(4):851–859.
- Cupp, E.W.; W.F. Scherer y J.V. Ordonez. 1979. «Transmission of *Venezuelan encephalitis virus* by naturally infected *Culex (Melanoconion) opisthopus*». *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 28(6):1060-1063.
- de Brito, C.L.; B.R. Quinan, R.F.V. Novaes, F.R. dos Santos, E.G. Kroon, C.A. Bonjardim y P.C.P. Ferreira. 2007. «*Caraparu virus* (group C *Orthobunyavirus*): sequencing and phylogenetic analysis based on the conserved region 3 of the RNA polymerase gene». *Virus Genes*. 35:681–684.
- Dégallier, N.; A.P.A. Travassos da Rosa, P.F.C. Vasconcelos, J.P. Hervé, G.C. Sá Filho, J.F.S. Travassos da Rosa, E.S. Travassos da Rosa y S.G. Rodrigues. 1992. «Modifications of arbovirus transmission in relation to construction of dams in Brazilian Amazonia ». *Journal of the Brazilian Association for the Advancement of Science*. 44(2):124–135.
- Dunn, E.F.; D.C. Pritlove y R.M. Elliott. 1994. «The S RNA genome segments of *Batai*, *Cache valley*, *Guaroa*, *Kairi*, *Lumbo*, *Main drain* and *Northway* bunyaviruses: sequence determination and analysis». *Journal of General Virology*. 70:1281–1285.
- Elliott, R.M. 2009. «Bunyaviruses and climate change». *Clinical Microbiology and Infection*. 15(6):510–517.
- Fauquet, C.M.; M.A. Mayo, J. Maniloff, U. Desselberger y L.A. Ball (Editores). 2005. *Virus Taxonomy: VIIIth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Elsevier Academic Press. 1162 págs.

- Forattini, O.P.; A.C. Gomes, I. Kakitani y D. Marucci. 1991. «Observações sobre domiciliação de mosquitos *Culex (Melanoconion)*, em ambiente com acentuadas modificações antrópicas». *Revista de Saúde Pública*. 25(4):257–266.
- Galindo, P. 1969. «Notes on the Systematics of *Culex (Melanoconion) taeniopus* Dyar and Knab and Related Species, Gathered During Arbovirus Investigations in Panama». *Mosquito Systematics Newsletter*. 1(4):82–89.
- Galindo, P. y S. Srihongse. 1967. «Transmission of arboviruses to hamsters by the bite of naturally infected *Culex (Melanoconion)* mosquitoes». *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 16(4):525–530.
- ‡ Gao, H.; I. Aban y C.R. Katholi. 2006. «Two-sided Hypothesis Testing Based on Pool Screening with Unequal Pool Sizes». Biostatistics Department Technical Report, Department of Biostatistics, School of Public Health, University of Alabama at Birmingham. 19 págs. Disponible en: <https://www.soph.uab.edu/bst/technical>
- Gu, W.; R. Lampman y R.J. Novak. 2003. «Problems in estimating mosquito infection rates using MIR». *Journal of Medical Entomology*. 40:595–596.
- Gu, W.; R. Lampman y R.J. Novak. 2004. «Assessment of arbovirus vector infection rates using variable size pooling». *Medical and Veterinary Entomology*. 18:200–2004.
- Gu, W. y R.J. Novak. 2004. «Short report: Detection probability of arbovirus infection in mosquito populations». *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 71(5):636–638.
- Gu, W.; T.R. Unnasch, C.R. Katholi, R. Lampman y R.J. Novak. 2008. «Fundamental issues in mosquito surveillance for arboviral transmission». *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 102:817–822.

Hoffmann, P.R.; R.J. Woodrow, P.S. Calimlim, R. Sciulli, P.V. Effler, V. Miyamoto, A. Imrie, R. Yanagihara y V.R. Nerurkar. 2004. «*West Nile virus* Surveillance: A Simple Method for Verifying the Integrity of RNA in Mosquito (Diptera:Culicidae) Pools». *Journal of Medical Entomology*. 41(4):731–735.

I.C.T.V.dB Management. 2006. 00.011.0.01. *Orthobunyavirus*. En: I.C.T.V.dB - The Universal Virus Database, versión 4. Büchen-Osmond, C. (Editor), Columbia University, New York, U.S.A.

‡ I.C.T.V.dB - The Universal Virus Database, v. 4.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/I.C.T.V.db/I.C.T.V.dB/>

Katholi, C.R. y I. Aban. 2009. «Investigation of the Distribution of the Score Statistic for a Simple Hypothesis in Pool Screening». Biostatistics Department Technical Report, Department of Biostatistics, School of Public Health, University of Alabama at Birmingham. 31 págs. Disponible en:
<https://www.soph.uab.edu/bst/technical>

Katholi, C.R. y T.R. Unnasch. 2006. «Important experimental parameters for determining infection rates in arthropod vectors using pool screening approaches». *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 74(5):779–785.

Katholi, C.R. 2006. «Estimation of Prevalence by Pool Screening With Equal Sized Pools and a Negative Binomial Sampling Model». Biostatistics Department Technical Report, Department of Biostatistics, School of Public Health, University of Alabama at Birmingham. 19 págs. Disponible en:
<https://www.soph.uab.edu/bst/technical>

Katholi, C.R.; L. Toé, A. Merriweather y T.R. Unnasch. 1995. «Determining the prevalence of *Onchocerca volvulus* infection in vector populations by PCR screening of pools of black flies». *Journal of Infectious Diseases*. 172:1414–1417.

Kukkonen, S.K.J.; A. Vaheri y A. Plyusnin. 2005. «L protein, the RNA-dependent RNA polymerase of hantaviruses». *Archives of Virology*. 150:533–556.

- Kuno, G.; C.J. Mitchell, G.J. Chang y G.C. Smith. 1996. «Detecting Bunyaviruses of the Bunyamwera and California Serogroups by a PCR Technique». *Journal of Clinical Microbiology*. 34(5):1184–1188.
- Lambert, A.J. y R.S. Lanciotti. 2009. «Consensus Amplification and Novel Multiplex Sequencing Method for S Segment Species Identification of 47 Viruses of the *Orthobunyavirus*, *Phlebovirus* And *Nairovirus* Genera of the Family *Bunyviridae*». *Journal of Clinical Microbiology*. 47(8):2398–2404.
- Lambert, A.J. y R.S. Lanciotti. 2008. «Molecular characterization of medically important viruses of the genus *Orthobunyavirus*». *Journal of General Virology*. 89:2580–2585.
- Lanciotti R. S.; A.J. Kerst, R.S. Nasci, M.S. Godsey, C.J. Mitchell, H.M. Savage, N. Komar, N.A. Panella, B.C. Allen, K.E. Volpe, B.S. Davies y J.T. Roehrig. 2000. «Rapid Detection of West Nile Virus from Human Clinical Specimens, Field-Collected Mosquitoes, and Avian Samples by a TaqMan Reverse Transcriptase-PCR Assay». *Journal of Clinical Microbiology*. 38(11):4066–4071.
- LeDuc, JW. 1987. «Epidemiology and ecology of the California serogroup viruses». *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 37(3):60S–68S.
- Mir, M.A. y A.T. Panganiban. 2006. «The bunyavirus nucleocapsid protein is an RNA chaperone: Possible roles in viral RNA panhandle formation and genome replication». *RNA*. 12:272–282.
- Monzón, M.L. 2007. «Marco metodológico». En *Estudio de la densidad relativa de Culex quinquefasciatus y detección de Flavivirus en zancudos de esta especie capturados en el municipio de Puerto Barrios, Izabal, Guatemala*. Tesis de licenciatura de la Universidad del Valle de Guatemala. págs. 21-27.
- Moraes, L.T. 2007. «Emergent arboviruses in Brazil». *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 40(2):224–229.

- Mores, C.N.; M.J. Turell, J. Dyer y C.A. Rossi. 2009. «Phylogenetic Relationships Among Orthobunyaviruses Isolated from Mosquitoes Captured in Peru». *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*. 9(1):25–32.
- Nakouné, E.; S. Gribaldo, C. Finance, A. Le Faou y B.H. Rihn. 2007. «Molecular characterization of African orthobunyaviruses». *The Journal of General Virology*. 88:1761–1766.
- ‡ Nichol, S.T. 2001. «Bunyaviruses». En *Fields Virology*, de Knipe, D.M. y P.M. Howley (Editores). 4ª Edición. Philadelphia, P.A., U.S.A. Lippincott Williams & Wilkins. págs. 1603–1633.
- Norris, D.E. 2004. «Mosquito-borne Diseases as a Consequence of Land Use Change». *EcoHealth*. 1(1):19–24.
- Nunes, M.T.; A.P.A. Travassos da Rosa, S.C. Weaver, R.B. Tesh y P.F.C. Vasconcelos. 2005. «Molecular Epidemiology of Group C Viruses (*Bunyaviridae*, *Orthobunyavirus*) Isolated in the Americas». *Journal of Virology*. 79(16):10561–10570.
- ‡ *Arthropod-borne and rodent-borne viral diseases*. Report of a WHO Scientific Group. 1985a. Organización Mundial de la Salud (OMS). *World Health Organization Technical Report Series*. 719. Ginebra. 116 págs.
- ‡ *Virosis transmitidas por artrópodos y roedores*. Informe de un Grupo Científico de la OMS. 1985b. Organización Mundial de la Salud (OMS). Traducción oficial del documento original en inglés. *World Health Organization Technical Report Series*. 719. Ginebra. 126 págs.
- ‡ *Arboviruses and Human Disease*. Report of a WHO Scientific Group. 1967. Organización Mundial de la Salud (OMS). *World Health Organization Technical Report Series*. 369. Ginebra. 84 págs.

- Quinan, B.R.; C.L. de Brito, R.F.V. Novaes, J.R. dos Santos, E.G. Kroon, C.A. Bonjardim y P.C.P. Ferreira. 2008. «Sequence and phylogenetic analysis of the large (L) segment of the *Tahyna virus* genome». *Virus Genes*. 36:435–437.
- R: A language and environment for statistical computing*. 2009. R Development Core Team, R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org>
- Reese, S.M.; B.J. Blitvich, C.D. Blair, D. Geske, B.J. Beaty y W.C. Black I.V. 2008. «Potential for *La Crosse virus* segment reassortment in nature». *Virology Journal*. 5:164.
- Sallum, M.A.M. y O.P. Forattini. 1996. «Revision of the Spissipes section of *Culex* (*Melanoconion*) (Diptera: Culicidae)». *Journal of the American Mosquito Control Association*. 12(3):517–600.
- Satoru, A.; D.O. Satoshi, M. Asakawa, J.K. Hae, G. Mocz, J. Arikawa, N. Okabe y R. Yanagihara. 2008. «Molecular phylogeny of a newfound hantavirus in the Japanese shrew mole (*Urotrichus talpoides*)». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 105(42):16296–16301.
- Scherer W.F.; R.W. Dickerman, E.W. Cupp y J.V. Ordonez. 1985. «Ecologic observations of *Venezuelan Encephalitis Virus* in vertebrates and isolations of Nepuyo and Patois viruses from sentinel hamsters at Pacific and Atlantic habitats in Guatemala, 1968-1980». *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 34(4):790–798.
- Scherer W.F.; R.W. Dickerman y J.V. Ordonez. 1983. «Enfermedad humana causada por el virus *Nepuyo*, un bunyavirus de Mesoamérica transmitido por mosquitos». *Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana*. 95(2):111–117.

- Scherer W.F.; R.W. Dickerman, J.V. Ordonez, C. Seymour, L.D. Kramer, P.B. Jahrling y C.D. Powers. 1976. «Ecologic studies of *Venezuelan Encephalitis Virus* and isolations of *Nepuyo* and *Patois* viruses during 1968-1973 at a marsh habitat near the epicenter of the 1969 outbreak in Guatemala». *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 25(1):151–162.
- Scherer, W.F.; S.C. Weaver, C.A. Taylor, E.W. Cupp, R.W. Dickerman y H.H. Rubino. 1987. Vector Competence of *Culex (Melanoconion) taeniopus* for Allopatric and Epizootic *Venezuelan Equine Encephalomyelitis* Viruses. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 36(1):194–197.
- ‡ Schmaljohn, C.S. y J.W. Hooper. 2001. «*Bunyaviridae*: The Viruses and Their Replication». En *Fields Virology*, de Knipe, D.M. y P.M. Howley (Editores). 4ª Edición. Philadelphia, P.A., U.S.A. Lippincott Williams & Wilkins. págs. 1581–1602.
- ‡ Schmaljohn, C.S y S.T. Nichol. 2007. «*Bunyaviridae*». En *Fields Virology*, de Knipe, D.M. y P.M. Howley (Editores). 5ª Edición. Philadelphia, P.A., U.S.A. Lippincott Williams & Wilkins. págs. 1741–1789.
- Soldan, S.M. y F. González-Scarano. 2005. «Emerging infectious diseases: The *Bunyaviridae*». *Journal of Neurovirology*. 11:412–423.
- Tauro, L.B.; F. Ludeña y M.S. Contigiani. 2009. «First detection of human infection by *Cache Valley* and *Kairi* viruses (*Orthobunyavirus*) in Argentina». *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 103:197–199.
- Toda, A. y R.E. Shope. 1967. «Transmission of Guamá and Oriboca viruses by naturally infected mosquitoes». *Nature*. 208:304.

- Vasconcelos, P.F.C.; A.P.A. Travassos da Rosa, F.P. Pinheiro, R.E. Shope, J.F.S.T Rosa, S.G. Rodrigues, M. Dégallier, E.S. Travassos da Rosa. 1998. «Arboviruses pathogenic for man in Brazil». En: *An overview of arbovirology in Brazil and neighbouring countries*, de Travassos da Rosa, A.P.A.; P.F.C. Vasconcelos y J.F.S.T Rosa (Editores). Instituto Evandro Chagas, Belém. págs.72–99.
- Vasconcelos, P.F.C.; A.P.A. Travassos da Rosa, S.G. Rodrigues, E.S. Travassos da Rosa, N. Dégallier y J.F.S. Travassos da Rosa. 2001. «Inadequate management of natural ecosystem in the Brazilian Amazon region results in the emergence and reemergence of arboviruses». *Cadernos de Saúde Pública*. 17(S):155–164.
- Vitek, C.J.; S.L. Richards, H.L. Robinson y C.T. Smartt. 2009. «A model to assess the accuracy of detecting arboviruses in mosquito pools». *Journal of the American Mosquito Control Association*. 25(3):374–378.
- Williams, M. y H.M. Savage. 2009. «Identification of *Culex (Melanoconion)* Species of the United States Using Female Cibarial Armature (Diptera:Culicidae)». *Journal of Medical Entomology*. 46(4):745–752.
- Yadav, P.D.; A.C. Mishra y D.T. Mourya. 2008. «Molecular characterization of *Umbre virus (Bunyaviridae)*». *Virology Journal*. 5:115.
- Zeier, M.; M. Handermann, U. Bahr, B. Rensch, S. Müller, R. Kehm, W. Muranyi y G. Darai. 2005. «New Ecological Aspects of Hantavirus Infection: A Change of a Paradigm and a Challenge of Prevention – A Review». *Virus Genes*. 30(2):157–180.

XI. APÉNDICE A

Control positivo de INKV

Control positivo: *Inkoo virus* cepa KN 3641

Secuencia del segmento S del virus *Inkoo* marcada con los sitios de hibridación de cada par de cebadores (ver clave de colores al final):

```
>inkv-kn3641-s inkoo virus strain kn3641 segment s;dbxref=vbrc:94284
      11...      21...      31...      41...      51...
1      AGTAGTGTGC TCCACttgaa tactttgaga atatattgaa ataaacttct ataaaaggca 60
61     tacttggttg atatgggaga tttggttttc tatgatgaag catccacagg tGCAAATGGA 120
121    TTTGATCCAG ATGCAGggtt tgtggcattt atggctgacc atggagaatc tatcaatttg 180
181    gcagccgtta ggatcttctt ccttaatgca gcaaaaagcca aagctgctct cgctcgtaaa 240
241    ccggagcgga aagctactcc taaatttgga gagtggcagg tggagattgt caataATCAT 300
301    TTTCCTGGAA ACAGGAACAA cccaattggt aacaacgatc ttaccatcca cgggctttct 360
361    ggatatttag caagatgggt ccttgagcat ttactgaag atgacgatga gtcccaaaga 420
421    gaactcataa gaagcaccat cataaaccog attgcagaat caaatggcat tcattggaac 480
481    aatggccag  aaatztatct  ttcatcttc  ccaggaacag  aaatgtttct  agaagttttc  540
541    aaattctacc ctttaacat  tggaaattac  agagtcaagc  atggtatgat  ggatcctcag  600
601    tacctaaaga aggcacttag  gcaacgttat  ggcaccttga  ctgcagagaa  atggatggca  660
661    cagaagacag  tgctcattgc  taaaagccta  aaggatgttg  agcagcttaa  atggggaaga  720
721    ggaggactta  gtgatgctgc  aagaactttc  ttgatcaaat  ttggtgtaaa  gctgccttaa  780
781    acaagagcag  tgacgaaatt  tgagtaaatt  ttggattaat  aaattgacaa  attttacaat  840
841    tggttaaaat  tcaattctta  taattggctt  ccaaaaggtc  ttatgaccat  aaacatagca  900
901    gcataatggg  tgggtggtag  gggacagcaa  cttaatagat  ctcaggatcat  tgatttagtt  960
961    aaatgtattc  aGTGGAGCAC ACTACT
```

Cuadro 1. Secuencias de los cebadores, sitio de hibridación y longitud del segmento amplificado con su pareja

Cebador	Secuencia (5'→3')	Hibridación (b)		Longitud (pb)
		Inicio	Fin	
Cal/Bwa F	GCAAATGGATTTGATCCTGATGCAG	112	136	209
Cal/Bwa R	TTGTTCCGTGTTTGCTGGAAAATGAT	320	296	
BunC F	AGTAGTGTGCTCCAC	1	15	986
BunC R	AGTAGTGTGCTCCAC	986	972	

XII. APÉNDICE B

Identificación morfológica de hembras *Cx. taeniopus* adultas

Como parte del trabajo de identificación de zancudos capturados, se almacena especímenes completos en una colección del equipo ArboZoo. Se utilizó una clave previamente publicada (Sallum y Forattini 1996) para comprobar la identidad de los especímenes de la colección inicialmente identificados como *Culex (Melanoconion) taeniopus*. El uso de esta clave fue sugerido por H.M. Savage, un colaborador de DVBID experto en el ro *Culex* (M. Müller, comunicación personal). Este trabajo fue realizado con el apoyo y la supervisión de María Luisa Müller, entomóloga del equipo ArboZoo.

Se seleccionó especímenes completos identificados como *Cx. taeniopus* para identificarlo morfológicamente según la clave de Sallum y Forattini. En base a estos caracteres se confirmó la identidad de los especímenes seleccionados. Esta confirmación respalda la identificación de los especímenes analizados en este trabajo de tesis. Un espécimen confirmado como *Cx. taeniopus* fue depositado en la colección de referencia del Laboratorio de Entomología Sistemática, Centro de Estudios Ambientales y Biodiversidad, UVG. El espécimen está disponible a solicitud para su observación. A continuación se presenta una descripción de los caracteres morfológicos presentes en *Cx. taeniopus*:

- 1) Escamas delgadas del vertex numerosas, parche de escamas anchas y espatuladas restringido a laterales del vertex (Figura 1);
- 2) Pleura con parche de escamas blancas espatuladas (Figura 2);
- 3) Tarsómeros traseros 1–4 con anillos blancos en las articulaciones, tarsómero 5 cubierto completamente por escamas blancas (Figura 3).

En la Figura 4 se señala la localización de los caracteres en el insecto.

Figura 1: Vertex de *Cx. taeniopus* (superficie superior de la cabeza). La flecha en el panel A señala las escamas delgadas. La flecha en el panel B señala el parche de escamas anchas y espatuladas.

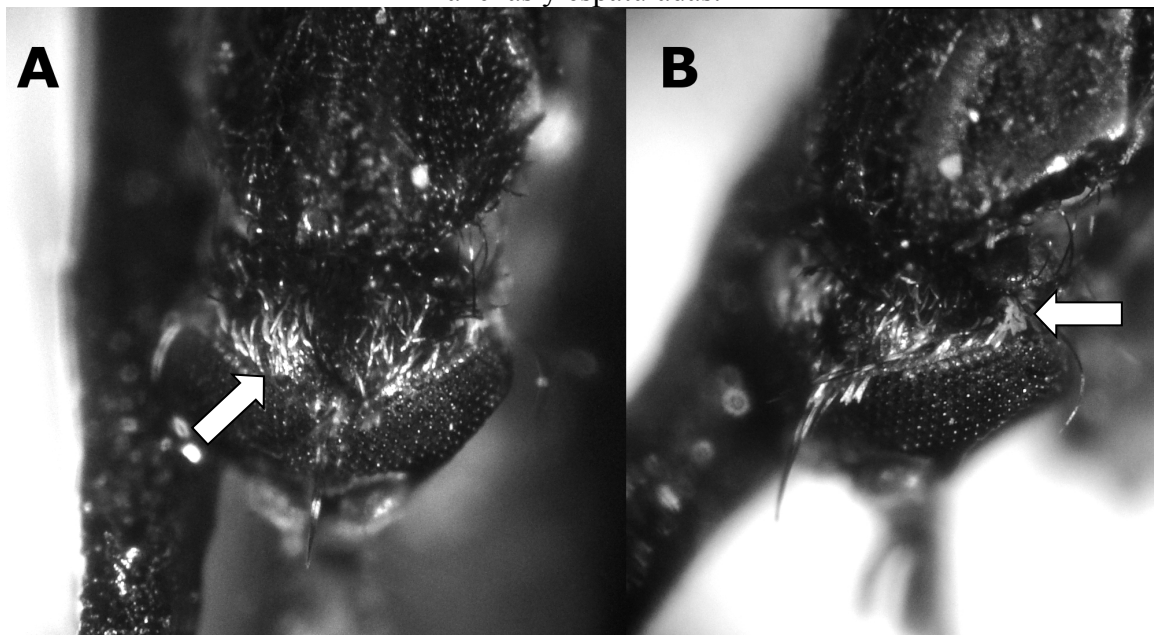


Figura 2: Pleura con dos parches de escamas blancas espatuladas. Las flechas señalan los parches de escamas.



Figura 3: Pata trasera de *Cx. taeniopus*. Los números en la derecha identifican cada tarsómero de la pata trasera (delimitados por las líneas horizontales punteadas). Se observa el anillo blanco característico en cada articulación entre los segmentos 1–4. Se observa el segmento 5 cubierto completamente por escamas blancas. La barra en la esquina inferior izquierda indica la escala.

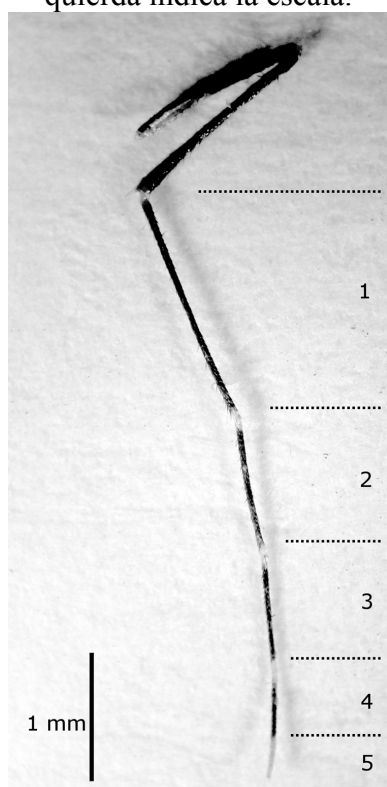
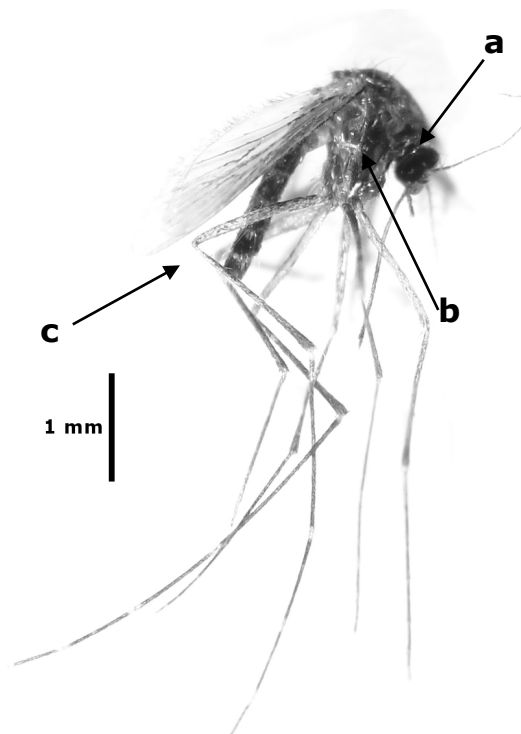


Figura 4: Hembra adulta de *Cx. taeniopus*. Las etiquetas indican la localización de: a) el vertex, b) la pleura, y c) las patas traseras.



Página dejada en blanco intencionalmente.