

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA
Facultad de Ciencias y Humanidades



Excelencia que trasciende

Patrones de alimentación de zancudos *Culex (Melanoconion) taeniopus* Dyar y Knab (Diptera: Culicidae) colectados de 2007 a 2008 en Puerto Barrios, Izabal

Trabajo de investigación presentado por
Ana Lucía Ramírez
para optar al grado de Licenciado en Bioquímica y Microbiología

Guatemala
2010

Patrones de alimentación de zancudos *Culex (Melanoconion)*
taeniopus Dyar y Knab (Diptera: Culicidae) colectados de 2007 a
2008 en Puerto Barrios, Izabal

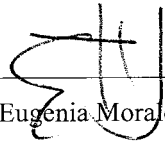
UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA
Facultad de Ciencias y Humanidades

Patrones de alimentación de zancudos *Culex (Melanoconion)*
taeniopus Dyar y Knab (Diptera: Culicidae) colectados de 2007 a
2008 en Puerto Barrios, Izabal

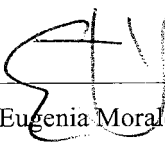
Trabajo de investigación presentado por
Ana Lucía Ramírez
para optar al grado de Licenciado en Bioquímica y Microbiología

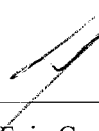
Guatemala
2010

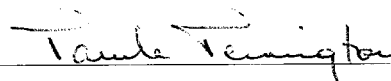
Vo.Bo.:

(f) 
Ma. Eugenia Morales-Betoulle, PhD

Tribunal Examinador:

(f) 
Ma. Eugenia Morales-Betoulle, PhD

(f) 
Lic. Enio Cano

(f) 
Pamela Pennington, PhD

Fecha de aprobación: Guatemala 11 de junio de 2010

PREFACIO

Este estudio fue financiado por fondos de Acuerdos Cooperativos (“Implementing Public Health Programs and Strengthening Public Health” y “Strengthening Infectious-Disease Research Capacity for Public Health”) entre los Centros para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC) de los Estados Unidos y el Centro de Estudios en Salud de la Universidad del Valle de Guatemala (CES-UVG). Además, se contó con fondos de FODECYT 03-2007.

Quiero agradecer a mi asesora Ma. Eugenia Morales-Betoulle PhD por haberme brindado la oportunidad de ser parte de este proyecto y por haberme orientado en este trabajo de investigación. También quiero agradecer a mi asesor Lic. Enio Cano por su ayuda y por haberme guiado en muchos aspectos de la investigación. Quiero agradecer también a Ana Silvia González por haber sido un apoyo durante todo el proceso de elaboración de este trabajo. Agradezco a todo el equipo de trabajo del proyecto ArboZoo: Celia Cordón-Rosales, Ma. Eugenia Morales-Betoulle, Ana Silvia González, Silvia Sosa, Ma. Luisa Müller, Ma. Renéé López, Bernarda Molina, Silvia Ramírez, Danilo Álvarez, Oscar de León, Alfonso Salam, Jorge Paniagua, Mónica Santiago, Carmen Yoc, Odeth Solórzano y todas las personas que participaron en el estudio. También agradezco a David Moran del equipo IEIP, al Departamento de Bioquímica y Microbiología, al Departamento de Biología y al Laboratorio de Protección Vegetal (LPV). Quisiera agradecer a Nicholas Komar, Harry Savage, Nicholas Panella, Barbara Johnson, Ann Powers y todas las demás personas de la División de Enfermedades Infecciosas Transmitidas por Vectores del CDC (DVBID-CDC) que estuvieron involucradas de alguna manera con el desarrollo de este trabajo de investigación. También agradezco a Pamela Pennington, PhD la orientación que me brindó como Directora de Departamento de Bioquímica y Microbiología.

Finalmente quiero agradecer a mis padres y a Chuck por todo el apoyo que me han brindando y a Julieta por haber sido un ejemplo en mi vida.

ÍNDICE

LISTA DE CUADROS.....	vi
LISTA DE FIGURAS.....	vii
RESUMEN	viii
ABSTRACT.....	ix
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. MARCO METODOLÓGICO.....	12
III. RESULTADOS.....	18
IV. DISCUSIÓN.....	24
V. CONCLUSIONES	30
VI. RECOMENDACIONES.....	31
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	32
VII. APÉNDICE	40

LISTA DE CUADROS

Cuadro	Página
Cuadro 1. Zancudos del subgénero <i>Melanoconion</i> relacionados a distintos arbovirus	4
Cuadro 2. Cebadores específicos para especies de vertebrados.....	16
Cuadro 3. Ingestas identificadas de zancudos <i>Cx. taeniopus</i> colectados en Puerto Barrios, Izabal de 2007 a 2008.	20

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
Figura 1. Organización del genoma mitocondrial en vertebrados.	7
Figura 2. Sitio de estudio ubicado en el municipio de Puerto Barrios, departamento de Izabal.	12
Figura 3. Diagrama de flujo para la identificación de ingesta sanguínea.	14
Figura 4. Verificación de la calidad del ADN extraído por medio de PCR ND4.	18
Figura 5. Optimización del PCR para la identificación de vertebrados utilizando los cebadores BM1 y BM2.	19
Figura 6. Ingestas identificadas de zancudos <i>Cx. taeniopus</i> en Puerto Barrios en los años 2007 y 2008.....	21
Figura 7. Proporciones de ingestas identificadas de zancudos <i>Cx. taeniopus</i> en Puerto Barrios en los distintos cuadrantes.	22
Figura 8. Relación entre la variabilidad de hospederos identificados y la densidad de zancudos <i>Cx. taeniopus</i>	23

RESUMEN

Existe una gran cantidad de patógenos transmitidos por artrópodos hematófagos que afectan tanto a humanos como a animales. Actualmente se conocen numerosos arbovirus que son transmitidos por zancudos, entre los cuales se pueden mencionar flavivirus, alfavirus y bunyavirus. Muchos de estos pueden ser zoonóticos: transmitirse de poblaciones animales a humanas. Es por esto que es de gran importancia conocer los ciclos de transmisión y la ecología de los patógenos para poder identificar los vectores, potenciales hospederos reservorios y factores de riesgo de transmisión de estas enfermedades.

Este trabajo de investigación tuvo como objetivo determinar los patrones de alimentación de los zancudos *Culex (Melanoconion) taeniopus* Dyar y Knab (Diptera: Culicidae) en el municipio de Puerto Barrios, departamento de Izabal, con individuos colectados de 2007 a 2008. Utilizando la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para amplificar regiones del citocromo b del genoma mitocondrial se llevó a cabo la identificación a nivel de subfilo (vertebrados), clase (aves y mamíferos) y en los casos posibles, especies (*Homo sapiens*, *Bos taurus*, *Canis familiaris*, *Capra hircus* y *Gallus gallus*) de los hospederos. Fue posible identificar el 85.3% de las ingestas. De éstas, 31.3% provenían de aves y 28.2% de mamíferos. El resto (14.7%) no fue identificado a nivel de clase. Entre las aves el hospedero preferido fue la gallina y entre los mamíferos el perro y la vaca. Únicamente se identificó una ingesta proveniente de humano. Además se observó que los patrones de alimentación de *Cx. taeniopus* en Puerto Barrios varían significativamente por año y por localidad. Se observó que existe estacionalidad en los patrones de alimentación. Por último, se observó que existe una relación entre la densidad relativa de zancudos y la diversidad de hospederos identificados. Estos resultados permitirán una mejor comprensión de las preferencias de alimentación de *Cx. taeniopus* potencial vector de arbovirus en Guatemala.

ABSTRACT

Numerous pathogens transmitted by haematophagous arthropods are known to cause illness in human and animal populations. Among these, a lot of arthropod borne viruses (arboviruses) can be zoonotic. The understanding of the transmission cycles and ecology of these viruses is useful to assess risk and to develop control strategies. This is why it is important to study the blood feeding behavior of haematophagous insects.

The aim of this study was to identify the feeding patterns of *Culex (Melanoconion) taeniopus* Dyar and Knab (Diptera: Culicidae) mosquitoes in the municipality of Puerto Barrios, department of Izabal using mosquitoes collected during 2007 and 2008. Host identification was carried by using the polymerase chain reaction (PCR) targeting regions of mitochondrial *cyt b* with primers that amplify for subphylum (vertebrates), order (avian and mammal) and species (*Homo sapiens*, *Bos taurus*, *Canis familiaris*, *Capra hircus* and *Gallus gallus*). From a total of 307 engorged mosquitoes tested, the hosts of 85.3% were identified. 31.3% of these were birds, 28.2% mammals and 41% other vertebrates. Chickens were the most common avian hosts and dogs and cows were the most common mammalian hosts identified. A single blood meal source was identified as human. Blood meal patterns showed a significant difference yearly and by location, suggesting a seasonal behavior. A correlation was found between mosquito density and the diversity of identified hosts. These results should provide a better understanding of the feeding preferences of *Cx. taeniopus* in Guatemala.

I. INTRODUCCIÓN

Los artrópodos hematófagos son importantes en los ciclos de transmisión de algunos patógenos, entre los que se pueden mencionar los arbovirus (virus transmitidos por artrópodos). En el caso de los zancudos, estos presentan un comportamiento de alimentación complejo en el que se involucran varios factores, que incluye el ciclo circadiano, estrategias de ubicación de hospederos, preferencias alimenticias y factores del hábitat. Entre estos, los zancudos con una preferencia de alimentación oportunista son de gran importancia en los ciclos de transmisión de ciertos virus. Es por esto que conocer los patrones de alimentación de los zancudos es útil para comprender el papel que estos juegan en los ciclos de transmisión y así poder observar factores de riesgo y tomar medidas de control. En Guatemala, se han realizado estudios de este tipo con zancudos del género *Culex* como parte de los estudios realizados en colaboración entre el Centro de Estudios en Salud de la Universidad del Valle de Guatemala (CES-UVG) y los Centros para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC). Estas investigaciones han brindado información muy valiosa sobre los ciclos de transmisión de arbovirus, principalmente el Virus del Oeste del Nilo (VON), un flavivirus.

Otro grupo de virus importante en Guatemala son los alfavirus. Aún cuando estos aparentemente dejaron de circular en Guatemala en los años sesentas, actualmente se han aislado alfavirus a partir de zancudos *Culex (Melanoconion) taeniopus* colectados en Puerto Barrios, Izabal (Komar y Powers, comunicación personal), lo que sugiere que estos zancudos podrían estar involucrados en los ciclos de transmisión de estos virus en Guatemala. Es por esto que surgió la idea de realizar este estudio para conocer los patrones de alimentación de *Cx. taeniopus*. Este estudio se realizó con zancudos colectados retrospectivamente como parte de un estudio de vigilancia de VON en Puerto Barrios. Los resultados obtenidos podrían ayudar a la comprensión de las preferencias de alimentación de *Cx. taeniopus* y del papel que este juega en los ciclos de transmisión de diversos arbovirus en la región.

A. Antecedentes

1. Comportamiento de alimentación de zancudos. Existen alrededor de 3,200 especies de

zancudos conocidas en el mundo. Los zancudos pueden ser encontrados en prácticamente todos los hábitats (urbanos, rurales, silvestres y desérticos) de probablemente todas las regiones de la tierra (Day 2005). Son activos a distintas horas del día. Hay algunos que se alimentan durante el día (diurnos), otros se alimentan durante el amanecer o atardecer (crepusculares) y otros durante la noche (nocturnos) (Bidlingmayer 1967). Únicamente las hembras son hematófagas debido a requerimientos metabólicos asociados al desarrollo de sus huevos y al uso de las proteínas de la sangre como una fuente de energía (Richards, Anderson y Smartt 2009). Otro componente de la sangre importante para el desarrollo de los huevos es el hierro, ingerido como hemoglobina en los eritrocitos y como transferrina férrica (Zhou *et al.* 2007).

Dependiendo de la especie, los zancudos tienen distintas preferencias alimentarias. Algunos prefieren la sangre de mamíferos, otros son ornitofílicos, es decir, prefieren la sangre de aves y otros se alimentan de reptiles y anfibios. De los que se alimentan de mamíferos, los que prefieren la sangre de humanos son denominados antropofílicos. En el caso de los zancudos antropofílicos, cuando estos se alimentan dentro de las casas se dice que son endofágicos y cuando se alimentan fuera de ellas son exofágicos (CDC 2008). También existen especies oportunistas, las cuales se alimentan de cualquier animal dependiendo de la disponibilidad de hospederos. También puede darse el caso donde los zancudos cambian sus preferencias alimentarias a lo largo del año, con dependencia de las estaciones. Se ha sugerido que este tipo de comportamiento puede ser de gran importancia para la transmisión de ciertos virus a poblaciones humanas cuando se intensifican epidemias de origen zoonótico (Kilpatrick *et al.* 2006).

Los zancudos encuentran a sus hospederos basándose en distintas estrategias. En general, el comportamiento de búsqueda se ha dividido en tres fases: la orientación de amplio ámbito (a más de cinco metros), la orientación de mediano ámbito y la orientación de corto ámbito (a menos de un metro) (Dekker, Geier y Cardé 2005). La orientación de amplio ámbito es aquella que involucra factores tales como el aroma del hospedero, siendo la principal señal el dióxido de carbono que emite. Además se ha observado que algunos zancudos se sienten atraídos por los olores de sus hospederos, como pueden ser los componentes volátiles de las plumas de las aves (Allan, Bernier y Kline 2006) y el 1-octen-3-ol en el aliento de bovinos (Kline *et al.* 1991), entre otros. La orientación a mediano ámbito involucra tanto el olfato como la visión del zancudo. Por último, la orientación de corto ámbito también involucra el olfato y la visión y además el reconocimiento de calor y la audición. Estudios han demostrado que ciertas especies de zancudos se sienten atraídas en base a los cantos de distintos anfibios (Bartlett-Healy, Crans y Gaugler 2008). Un último factor que determina el éxito de un zancudo para alimentarse es la abundancia de hospederos, especialmente para aquellos con patrones de alimentación oportunista (Hess, Hayes y Tempelis 1968). Se ha demostrado que existe una relación inversa entre la densidad de zancudos y la proporción que se logra alimentar exitosamente de un solo hospedero (Edman, Webber y Kale 1972). Esto se debe probablemente a que al aumentar la densidad de zancudos los hospederos adoptan estrategias defensivas, lo que aumenta la frecuencia de alimentación interrumpida y tiene como consecuencia ingestas parciales.

Otro factor involucrado en el éxito de la alimentación de los zancudos son las características del hábitat en el que se encuentran. Estudios realizados en California con *Culex tarsalis* mostraron que estos preferían alimentarse en sitios con vegetación alta, sin estar necesariamente asociados con los sitios que mostraban una mayor cantidad de hospederos potenciales (Lothrop y Reisen 2001). Se ha observado además que algunas especies prefieren volar en la parte alta de los árboles mientras otros vuelan a menor altura (Savage *et al.* 2008)

Luego de alimentarse los zancudos necesitan reposar. Se ha observado que los zancudos del subgénero *Melanoconion* (*Culex erraticus* y *Culex peccator*) prefieren reposar en sitios artificiales que en sitios naturales, como lo son recipientes y latas. Se ha sugerido que esto se debe a que los sitios artificiales les proporcionan una mayor superficie donde posarse y mayor cobertura. Además se ha visto que los individuos de estas especies prefieren descansar colgando de una superficie horizontal, lo que explica la preferencia por la cobertura (Burkett-Cadena, Eubanks y Unnasch 2008). En el caso de los zancudos antropofílicos, cuando estos descansan dentro de la casa se dice que son endofílicos y cuando descansan fuera se dice que son exofílicos (CDC 2008).

a. *Culex (Melanoconion) taeniopus* Dyar y Knab 1907. Estos zancudos son artrópodos, del orden Díptera, familia *Culicidae*, género *Culex* Linnaeus. La clasificación de *Cx. taeniopus* ha estado sujeta a confusión a través de los años debido a que fue descrito con base en una hembra de Blufffields, Nicaragua (Galindo 1969). Una forma ligeramente diferente fue descrita de Puerto Castilla, Honduras, como *Culex (Melanoconion) opisthopus* Komp 1926. Otra especie fue renombrada como *Culex cedecei* Stone y Hair 1969, de Florida, USA. Se tomó como sinónimo de *Cx. opisthopus* tanto *Cx. taeniopus* como *Cx. cedecei*. Belkin (1969) sinonimizó *C. cedecei* bajo *C. annulipes* Theobald 1907. Mas tarde, Galindo (1969) mantuvo esa sinonimia y además sinonimizó a *C. opisthopus* (las poblaciones de Honduras y Panamá) bajo *C. annulipes*, descrita originalmente de Jamaica. Finalmente, en base a estudios utilizando zancudos colectados en Guatemala y Florida y características morfológicas, análisis genético, y aspectos de la biología del vector (selección de hospedero y eficiencia vectorial), se separó *Cx. cedecei* de *Cx. taeniopus*. Actualmente al referirse a *Cx. taeniopus* se está haciendo referencia a la población de Guatemala y Nicaragua y al referirse a *Cx. cedecei* a la de Florida (Cupp 1989).

Todas las especies pertenecientes al subgénero *Melanoconion* se crían en charcos, siendo la única excepción cuatro especies las cuales se crían en hojas de bromelias. Únicamente la especie *taeniopus* se ha observado criándose en aguas subterráneas en piedra caliza o en las bases de los árboles. Los huevos son puestos individualmente en un solo lote. Se han logrado colectar tanto pupas como larvas en charcos en una variedad de hábitats, incluyendo charcos en pantanos con bastante sombra, estanques naturales y artificiales, ciénagas, lagos y orillas de ríos y canales parcialmente cubiertos o expuestos a la luz del sol.

Normalmente es difícil encontrar las formas inmaduras de ciertas especies, pero los adultos frecuentemente se colectan mientras descansan durante el día en hojarasca, troncos, suelo y la vegetación emergente utilizando trampas con cebo de luz o carnada animal. Estos zancudos se pueden encontrar en elevaciones que van desde el nivel del mar hasta 50 m. Además se sabe que son de actividad nocturna y se ha observado que se alimentan de la sangre de una variedad de vertebrados incluyendo aves, reptiles, roedores y humanos (Sirivanakarn 1982). Estudios realizados en Trinidad demostraron que su actividad nocturna depende de las fases de la luna (Davies 1975). Su distribución es principalmente neotropical, con la mayoría de especies en Centro América, y el norte de Sur América (Sirivanakarn 1982).

b. *Culex (Melanoconion)* como vector de arbovirus. Los zancudos del género *Culex* subgénero *Melanoconion* son de gran importancia en la transmisión de ciertos virus. En el caso de la encefalitis equina venezolana (VEEV), un alfavirus, más del 70% de los aislados de cepas enzoóticas provienen de este género, lo que sugiere que estos zancudos son los principales vectores de la mayoría de las cepas enzoóticas de VEEV (Galindo 1972). Además se han relacionado este género de zancudos con otros alfavirus, como la encefalitis equina del este (EEE), bunyavirus y flavivirus.

Cuadro 1. Zancudos del subgénero *Melanoconion* relacionados a distintos arbovirus

Especie de zancudo	Virus aislado	Localidad	Referencia
Alfavirus			
<i>Culex (Mel.) portesi</i>	VEEV Mucambo	Trinidad	Aitken <i>et al.</i> 1972
<i>Culex (Mel.) vomerifer</i>	VEEV ID	Colombia	Ferro <i>et al.</i> 2003
<i>Culex (Mel.) pedroi</i>	VEEV ID	Colombia	Ferro <i>et al.</i> 2003
<i>Culex (Mel.) adamesi</i>	VEEV ID	Colombia	Ferro <i>et al.</i> 2003
<i>Cx. cedecei</i>	VEEV Everglades	Florida	Chamberlain <i>et al.</i> 1964
<i>Culex (Mel.) aikenii</i> sensu lato (<i>ocossa</i> y <i>panocossa</i>)	VEEV ID	Panamá	Galindo y Grayson 1971
<i>Cx. taeniopus</i>	VEEV IE	Guatemala	Cupp, Scherer y Ordoñez 1979
<i>Cx. taeniopus</i>	EEE	Panamá	Srihongse y Galindo 1967
Bunyavirus			
<i>Cx. taeniopus</i>	Nepuyo	Guatemala	Cupp <i>et al.</i> 1986
<i>Cx. taeniopus</i>	Guama	Trinidad	Todda y Shope 1965
<i>Culex (Mel.) portesi</i>	Guama	Trinidad	Todda y Shope 1965
Flavivirus			
<i>Cx. taeniopus</i>	Encefalitis de St. Louis	Trinidad	Aitken <i>et al.</i> 1964

Se ha observado que algunas especies de estos zancudos presentan alta susceptibilidad a la infección por VEEV enzoóticos. Además varios de estos se alimentan de especies de pequeños mamíferos que funcionan como hospederos reservorios. De igual manera, la transmisión puede verse favorecida por varios factores como la longevidad de los zancudos, el tamaño de las poblaciones de estos mismos y los hábitats que mantienen grandes poblaciones de hospederos reservorios (Barrera 2002).

2. Estudio de patrones de ingesta sanguínea. El estudio de los patrones de ingesta

sanguínea en insectos hematófagos es de gran importancia, tanto para comprender la biología de estos vectores, como el ciclo y patrones de transmisión de los patógenos. Cuando se habla de patógenos zoonóticos en particular, es necesario caracterizar la relación que existe entre el potencial vector y las poblaciones de hospederos animales y humanos. En efecto, la interacción entre el vector y los hospederos puede amplificar o diluir la transmisión del patógeno (Schmidt y Ostfeld 2001) dependiendo de varios factores (competencia del hospedero como reservorio, abundancia relativa de las especies y preferencias alimenticias del vector). Las preferencias alimentarias del vector dependen también de otros factores como el tamaño del hospedero, su proximidad y sus mecanismos de defensa (Keesing 2006).

Un estudio de los patrones de alimentación de *Culex (Melanoconion) taeniopus* de La Avellana, Guatemala, realizados entre 1977-1980 demostró que estos tienen un amplio rango de hospederos. La mayoría de las ingestas sanguíneas provenían de mamíferos, siendo los preferidos los bovinos (32%), seguidos por equinos (11.0%), roedores (5.9%), y humanos (0.3%). En cuanto a las aves, se observó una mayor preferencia por Ciconiformes (4.0%) sobre Passeriformes. Los reptiles representaron el 22.7% de las ingestas (Cupp *et al.* 1986). Recientemente, se observó que estos zancudos se alimentan de iguanas, ranas, lagartos y lagartijas de diferentes especies (Kent *et al.* 2009).

a. Métodos para la identificación de ingesta sanguínea. A lo largo de los años se han desarrollado varias técnicas para caracterizar la fuente de alimentación de insectos hematófagos. Estas técnicas van desde la serología hasta métodos moleculares. Los primeros ensayos desarrollados para la identificación de la ingesta sanguínea se basaban en pruebas serológicas para detectar la precipitina (Bull 1923) o inhibición de la hemaglutinación. También se trabajaron técnicas de inmunofluorescencia (McKinney, Spillane y Holden 1972). Posteriormente se desarrollaron técnicas de ELISA utilizando anticuerpos dirigidos a hospederos específicos (Tempelis 1975). Se demostró que la prueba de la precipitina es más específica y sensible que la prueba de ELISA y que esta técnica es de bajo costo y fácil de realizar (Gomes *et al.* 2001). Sin embargo, las pruebas basadas en la interacción antígeno-anticuerpo presentan algunas desventajas, como la posibilidad de reacciones cruzadas entre especies, lo cual puede causar errores en la identificación. Una limitación de estas técnicas es que se deben producir anticuerpos específicos contra cada una de las posibles especies que puedan servir como fuente alimenticia

para los zancudos. Además, estos análisis se basan en proteínas, las cuales pueden desnaturalizarse cuando no se manejan en las condiciones adecuadas (Parson *et al.* 2000).

Actualmente, los métodos moleculares son los más utilizados. Entre las ventajas que estos presentan se encuentra un nivel mayor de sensibilidad y especificidad. Aunque los zancudos ingieren alrededor de 30 μ L de sangre (Ngo y Kramer 2003), esta contiene un gran número de células. La mayoría de las células de los vertebrados contiene tanto un núcleo como mitocondrias. Una excepción son los eritrocitos de mamíferos que no contienen organelos y por lo tanto tampoco se puede obtener ADN de ellos. Sin embargo, los leucocitos sí poseen organelos y material genético que puede identificarse (Mukabana, Takken y Knols 2002). El método más utilizado es la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para amplificar secuencias específicas a partir de las cuales se puede llevar a cabo la posterior identificación del material genético. Las técnicas de detección por PCR utilizan diferentes marcadores moleculares. Algunas se basan en la amplificación de regiones de genes de ARN ribosomal, los cuales son altamente conservados. Alternativamente, se puede utilizar genes nucleares para la identificación de la ingesta sanguínea en artrópodos. Sin embargo la utilización de estos últimos presenta la limitación que estos se encuentran como dos copias en la célula y que por lo general, se cuenta con poca muestra, por lo que muchas veces es necesario clonar los productos obtenidos para su identificación (Kent 2009).

En la última década se ha preferido utilizar técnicas de detección basadas en marcadores moleculares del genoma mitocondrial (Figura 1). El genoma mitocondrial es independiente del genoma nuclear y se presenta como una secuencia circular. En el caso de los animales, estos poseen genomas mitocondriales pequeños, de alrededor de 16.5kb en el caso de mamíferos, codificando para trece proteínas (Lewin 2008). Entre estas se encuentran las proteínas del complejo respiratorio celular incluyendo NADH, citocromos y ATP sintasa (Gray, Burger y Lang 1999). Además también se encuentran codificados dos ARNr y 22 ARNt necesarios para la traducción de las proteínas. Otra característica del genoma mitocondrial es que este evoluciona a una velocidad mayor que el ADN nuclear, probablemente debido a una alta tasa de mutación (Brown, George y Wilson 1979). Una ventaja de utilizar marcadores del genoma mitocondrial es que las mitocondrias cuentan con un gran número de copias dentro de la célula, lo que permite llevar a cabo la identificación utilizando la pequeña cantidad de muestra con la que se cuenta. Por otra parte el genoma mitocondrial carece de intrones, no sufre recombinación y se hereda de forma haploide a partir de las madres (Hebert *et al.* 2003). Finalmente, en la actualidad se cuenta con una gran cantidad de secuencias completas del genoma mitocondrial de vertebrados (Boore 1999). Todas estas características hacen del ADN mitocondrial un buen candidato para realizar estudios genéticos. Los métodos basados en detección de ADN mitocondrial han sido de hecho, ampliamente utilizados tanto en estudios de identificación de especies como en estudios filogenéticos (Kocher 1989). Entre los marcadores de este tipo, se encuentran *COI* (citocromo c oxidasa I) y *cytb* (citocromo b), ver Figura 1. El gen *cytb* codifica para la subunidad catalítica central del complejo III del sistema de fosforilación oxidativa en la mitocondria (Hatefi 1985). El gen del citocromo b mitocondrial es uno de los genes de vertebrados de los cuales se cuenta con

b. Factores importantes en el análisis de ingesta sanguínea. El principal factor para el análisis de la ingesta sanguínea en artrópodos es la cantidad y calidad del ADN con el que se cuenta para poder llevar a cabo una adecuada identificación. Esto depende de varios elementos, principalmente: la forma de preservación de los zancudos alimentados, la concentración de ADN presente y el tiempo de colecta. Es necesario almacenar las muestras a bajas temperaturas para evitar la degradación de los ácidos nucleicos, lo que puede dificultar la identificación (Mukabana 2002). Con respecto al tiempo de colecta, se ha observado que estos deben ser colectados tan pronto como se han alimentado, ya que luego de 8 horas la proporción de ingestas que pueden ser identificadas comienza a disminuir hasta llegar a 50% a las 15 horas debido a los procesos digestivos del mosquito (Mukabana *et al.* 2002). Se ha observado que la digestión ocurre más rápido en los trópicos que en otros climas donde la temperatura es menor (Lee 2002).

c. Relación entre los patrones de ingesta sanguínea e infección por arbovirus en zancudos hematófagos. En paralelo de los estudios de patrones de ingesta sanguínea en insectos hematófagos se puede realizar pruebas para la detección de patógenos, como arbovirus en las muestras. De esta forma se puede relacionar la presencia de un virus en el potencial zancudo vector y el origen de la ingesta sanguínea a partir de un potencial hospedero. Sin embargo, varios factores pueden interferir con este tipo de análisis. Uno de los principales consiste en distinguir si el vector se encontraba infectado antes de la ingesta o si el patógeno se encuentra en la sangre ingerida. Para poder realizar esta distinción es necesario conocer la forma en que el virus se disemina en el potencial vector. Por ejemplo, en el caso del virus de la encefalitis equina venezolana (VEEV), se han realizado estudios utilizando microscopía electrónica de transmisión los cuales han permitido conocer los patrones de infección del virus dentro de *Cx. taeniopus*. Utilizando zancudos adultos de La Avellana, Guatemala, un foco enzoótico de VEEV, se les suministró el virus aislado de Guatemala en 1968 (VEEV subtipo IE No. 68U201) (Weaver 1986). En estos experimentos, se logró observar que inicialmente ocurría el movimiento del virus a través del tracto digestivo. Luego, tres o cuatro horas más tarde, la replicación ya se había llevado a cabo en el mesenterón y las partículas virales migraban al hemocele. Finalmente, dos días después de la infección, fue posible observar una diseminación más allá del intestino. En este momento, las partículas virales se encontraron en los ganglios nerviosos abdominales y en el proctodeo. Los viriones fueron observados en las glándulas salivares a los cuatro días post infección, por lo que se puede asumir que posiblemente la transmisión del virus ocurriría en este momento (Weaver 1986). En otros estudios con Virus del Oeste del Nilo, se ha podido demostrar que los virus se diseminan hasta las patas de ciertas especies de zancudos (Turell *et al.* 2000). Es por esto que aunque se encuentre a un zancudo positivo para un virus y con ingesta sanguínea de cierto origen, se debe realizar experimentos complementarios para determinar si el virus estaba diseminado en el zancudo o proviene de la sangre encontrada en este mismo.

Este estudio pretende identificar los hospederos de los cuales se alimenta *Cx. taeniopus* en el municipio de Puerto Barrios, departamento de Izabal en Guatemala, utilizando métodos moleculares basados en la amplificación de fragmentos del citocromo b de vertebrados. Este estudio complementará otros estudios que determinarán la infección de esta especie por arbovirus, en particular Bunyavirus, realizado dentro del mismo laboratorio.

B. Justificación

En la actualidad, se conoce una gran variedad de patógenos como arbovirus (virus transmitidos por artrópodos), bacterias y parásitos transmitidos por insectos hematófagos. Estos pueden afectar tanto a los humanos como a animales silvestres o domésticos. Se ha observado que muchos de estos patógenos no reciben la atención que requieren, por lo que pueden ser clasificados como “agentes causales de enfermedades tropicales desatendidas” (LeBeaud 2008). Estos afectan principalmente a comunidades pobres y representan una gran carga para la población al ocasionar pérdidas tanto humanas como económicas. Por ejemplo, debido a este tipo de infecciones se pierden vidas humanas o el potencial de productividad de las personas en edad de trabajar o se pueden perder animales valiosos para la economía familiar, etc. Es por esto que definir los ciclos de transmisión de estas enfermedades es de gran importancia. En particular es necesario conocer la ecología del patógeno, desde la susceptibilidad de los hospederos reservorios hasta la capacidad vectorial y la ecología de los distintos vectores. Parte de estos estudios consisten en determinar la relación hospederos reservorios-vectores. Para esto es necesario identificar los patrones de alimentación del potencial vector respecto al hospedero. Conocer los patrones de alimentación también permite observar cambios en el comportamiento de los vectores hacia los hospederos a lo largo de diferentes localidades geográficas, estaciones, etc. Esto es importante para evaluar factores de riesgo que pudieran existir en caso de cambios en la alimentación de zancudos infectados por patógenos como arbovirus.

Un ejemplo de arbovirus que circula en zancudos y vertebrados de Guatemala es VEEV. A pesar que este aparentemente dejó de circular en Guatemala en los años sesentas, actualmente se han obtenido aislados de alfavirus en *Cx. taeniopus* colectados en Puerto Barrios en el año 2007 (Komar y Powers, comunicación personal), los cuales podrían estar involucrados en brotes de encefalitis en equinos o causar enfermedad en humanos. Como se mencionó en la sección de introducción, se ha observado que *Cx. taeniopus* tiene la capacidad de actuar como vector transmitiendo este virus. Sin embargo, se ha caracterizado poco su ingesta sanguínea por lo que no se ha publicado mucha información respecto a sus patrones de alimentación. Esto debe

conocerse para identificar los principales hospederos de estos zancudos y determinar si se alimentan principalmente de humanos, de equinos o de otros vertebrados.

Estudios similares, se han realizado para otros zancudos del género *Culex* que transmiten otros virus (Apperson *et al.* 2004, Elizondo-Quiroga *et al.* 2006, Kent *et al.* 2009), aportando una gran cantidad de información sobre estos y sobre los ciclos de transmisión de estos virus. Por ejemplo, en el caso del virus del oeste del Nilo, se ha observado que los zancudos vectores muestran preferencia por hospederos aviares sobre humanos, lo que ayudaría a mantener ciclos de amplificación del virus. Además, ha sido posible llevar a cabo estudios de evaluación de riesgo tomando en cuenta la abundancia, la prevalencia de infección, la competencia vectorial y las preferencias de alimentación de los zancudos (Kilpatrick *et al.* 2005). Esto permite observar la importancia que tiene un zancudo como vector del patógeno para así desarrollar mejores medidas de control.

Con los resultados del presente trabajo se pretende tener una mejor comprensión del comportamiento de alimentación de *Cx. taeniopus* en nuestro país. Se espera que la información obtenida pueda ser utilizada por otros estudios para poder entender mejor la ecología de arbovirus como Bunyavirus o VEEV transmitidos por estos zancudos y establecer factores de riesgo asociados a la presencia de estos vectores.

C. Objetivos

1. General. Identificar a algunos animales domésticos como hospederos a partir de los cuales se alimentaron zancudos *Culex (Melanoconion) taeniopus* capturados en Puerto Barrios, Guatemala de 2007-2009.

2. Específicos

- a. Estandarizar el PCR para la identificación de hospederos vertebrados basado en la amplificación de un fragmento del citocromo b.
- b. Establecer si existe alguna diferencia entre las ingestas provenientes de hospederos mamíferos y aviares en zancudos capturados en las distintas localidades (urbana y rural).
- c. Establecer si existe estacionalidad en los patrones de alimentación de estos zancudos.

D. Hipótesis

H_0 : *Culex (Melanoconion) taeniopus* no muestra una preferencia por los hospederos mamíferos sobre las aves.

H_1 : *Culex (Melanoconion) taeniopus* muestra una preferencia por los hospederos mamíferos.

H_0 : No existe una diferencia entre las ingestas provenientes de hospederos mamíferos y aviares en las diferentes localidades.

H_1 : Existe una diferencia entre las ingestas provenientes de hospederos mamíferos y aviares en las diferentes localidades.

H_0 : No existe estacionalidad en los patrones de alimentación de estos zancudos.

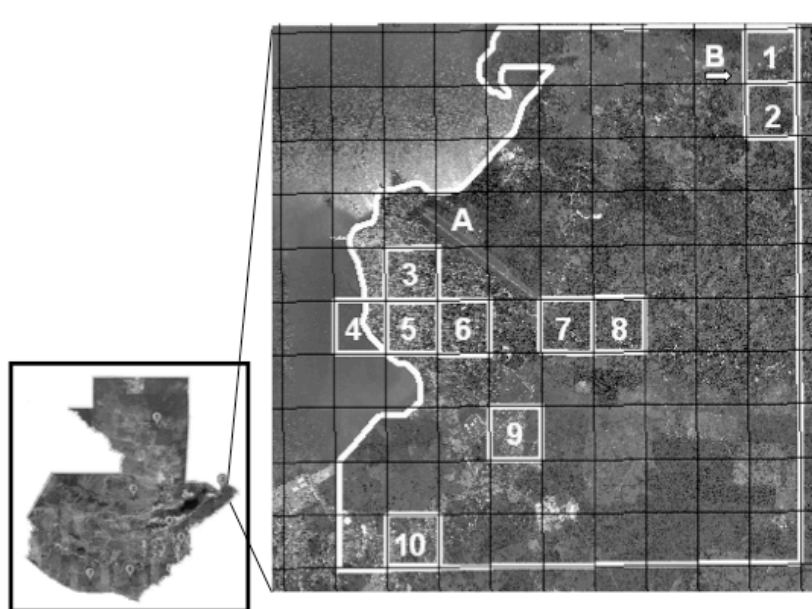
H_1 : Existe estacionalidad en los patrones de alimentación de estos zancudos.

II. MARCO METODOLÓGICO

A. Procedimiento

1. Sitio de estudio. Se trabajó con zancudos colectados del año 2007 al año 2008 en el municipio de Puerto Barrios (55°50'N y 88°28'O), Departamento de Izabal. Las colectas fueron realizadas en 10 sitios de estudio previamente definidos. Estos sitios de estudio abarcan áreas urbanas, periurbanas, rurales y perirurales, siendo esta clasificación realizada de forma empírica en base a la vegetación del área (Monzón 2007).

Figura 2. Sitio de estudio ubicado en el municipio de Puerto Barrios, departamento de Izabal. Los cuadrantes 1, 2, 7 y 8 son considerados como cuadrantes rurales y los cuadrantes 3, 4, 5, 6, 9 y 10 como no rurales.



(Imagen proporcionada por Morales-Betoulle 2010)

2. Método de colecta. La colecta se realizó utilizando trampas CDC de luz (Sudia y Chamberlain 1962) con hielo seco como sebo y trampas grávidas (Reiter 1983) con estiércol de vaca como sebo. En cada sitio de colecta se colocó una trampa CDC (John W. Hock CO., Gainesville, FL) y una trampa grávida por una noche cada mes. En el caso de meses con seroconversiones de virus del oeste del Nilo (VON) en gallinas centinelas, se aumentó el esfuerzo de captura. Los zancudos colectados fueron colocados en hielo seco y almacenados en tubos criogénicos separados en lotes por localidad, fecha y tipo de trampa. Posteriormente fueron

enviados al laboratorio donde fueron identificados por entomólogas en base a características morfológicas (Sallum y Forattini 1996).

3. **Disecación de zancudos alimentados.** Los zancudos se disectaron para separar el abdomen de resto del cuerpo. Este procedimiento se realizó en una cabina de bioseguridad nivel 2+. Se colocó un zancudo en un portaobjetos y se separó el abdomen utilizando pinzas estériles. Cada abdomen se colocó en un tubo rotulado con el número correspondiente al individuo. El resto del cuerpo (cabeza, tórax y patas) se colocó en otro tubo rotulado con su número correspondiente. Las pinzas se lavaron con Extran y luego con etanol entre cada uso. Se utilizó un lado de cada portaobjetos por cada dos zancudos para evitar la contaminación como descrito en un trabajo previo de nuestro laboratorio (González 2009).

4. **Macerado de abdómenes.** Para macerar los especímenes secos, los abdómenes se rehidrataron con 100 μ L de solución SSC 2x (Sigma, St. Louis, MO) al 1% de SDS (Bioamerica, Homestead, FL) durante 20 minutos y se lavaron con solución TE 1X (1.0 M Tris-HCl, pH 8.0, EDTA 0.1 M). Cada abdomen se maceró en 400 μ L de PBS utilizando un pistilo. Los abdómenes macerados se almacenaron a -70°C .

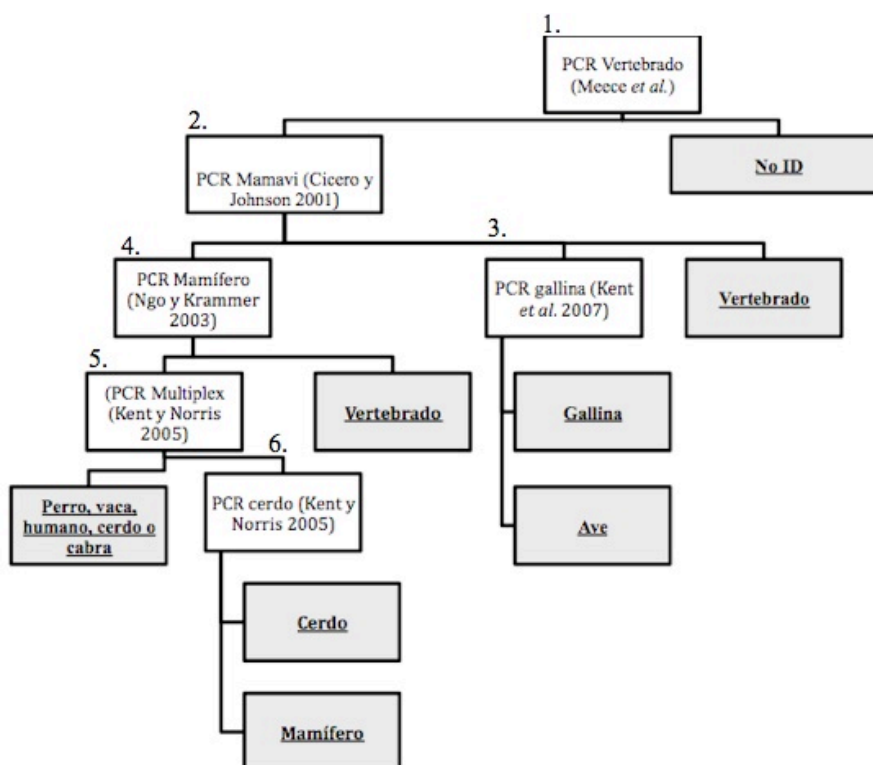
5. **Extracción de ADN.** La extracción se llevó a cabo utilizando el kit QIAamp viral RNA mini kit (Qiagen, Valencia, CA) el cual coextrae ADN y ARN, según las especificaciones del fabricante. El ADN se eluyó en 100 μ L de solución AVE (0.04% azida de sodio) (Qiagen) y se almacenó hasta su posterior uso a -70°C .

6. **Control de calidad del ADN obtenido.** Para garantizar la calidad del ADN extraído se llevó a cabo la amplificación de una región de la subunidad 4 de la NADH deshidrogenasa del genoma mitocondrial del zancudo. Se utilizaron los cebadores ND4for (5'-GTDYATTTATGATTRCCTAA-3') y ND4rev (5'-CTTCGDCTTCCWADWCGTTC-3') los cuales amplifican para un producto de 400 pares de bases (Gorrochotegui-Escalante *et al.* 2000). Se trabajó con 1.0 μ L de cada cebador (100 pmol), 2.0 μ L de buffer 5x (Tris 50 mM, pH 8.3, KCl 250 mM, MgCl 7.50 mM, gelatina 0.05%) (Promega, Madison, WI), 0.5 μ L de DNTPs (250 μ M por cada uno) (Applied Biosystems, Foster City, CA), 1.0 U de Taq ADN polimerasa (Promega) y 1.0 μ L de ADN. Se trabajó con reacciones de 20 μ L por lo que el volumen se completó con agua libre de ADNasas (Invitrogen). Se trabajó con un termociclador ATC 4012, Nyx Technik,

Inc (San Diego, CA). El programa de amplificación consistió en 3 minutos a 95 °C, diez ciclos de 30 segundos a 92°C, 60 segundos a 48°C y 72°C, seguidos por 42 ciclos de 30 segundos a 92°C, 35 segundos a 52°C y 40 segundos a 72°C, con un paso final de elongación de 5 minutos a 72°C. Los productos de la amplificación se visualizaron en un gel de agarosa al 2% con tinción de bromuro de etidio.

7. Identificación de hospederos. La identificación de hospederos se llevó a cabo utilizando cebadores dirigidos regiones del citocromo b del genoma mitocondrial y se siguió el siguiente orden (Figura 2): amplificación con cebadores específicos para vertebrados, luego la amplificación de las muestras de origen de mamífero o de aviar. Las muestras que resultaron positivas para mamíferos se confirmaron utilizando otro par de cebadores para mamíferos y luego se amplificaron utilizando cebadores para identificar humanos, vacas, perros o cabras. Aquellas muestras que no presentaron amplificación en este último ensayo se amplificaron utilizando cebadores específicos para cerdo. Las muestras que resultaron positivas para aves fueron amplificadas utilizando cebadores específicos para gallina.

Figura 3. Diagrama de flujo para la identificación de ingesta sanguínea. Los números indican el orden en el que se fueron realizando los ensayos.



La identificación de vertebrados se llevó a cabo con la amplificación de una región interna del citocromo b del genoma mitocondrial de vertebrados utilizando los cebadores BM1 (5'-CCCCTCAGAATGATATTTGTCCTCA-3') y BM2 (5'-CCATCCAACATCTCAGCATGATGAAA-3') los cuales tienen un producto de alrededor de 358 pares de bases (Meece *et al.* 2005). Se trabajó con 0.125 μ L de cada cebador (100 pmol), 5.0 μ L de buffer 5x (Tris 50 mM, pH 8.3, KCl 250 mM, MgCl 7.50 mM, gelatina 0.05%), 0.4 μ L de DNTPs (250 μ M por cada uno), 1.0 U de Taq ADN polimerasa, 2.0 μ L de ADN y 18.23 μ L de agua libre de ADNAsas. El programa de amplificación consistió en 3.5 minutos a 95°C, 36 ciclos de 30 segundos a 95°C, 50 segundos a 50°C y 40 segundos a 72°C, con un paso final de elongación de 5 minutos a 72°C. Los productos de la amplificación se visualizaron en un gel de agarosa al 2% con tinción de bromuro de etidio.

La identificación de orden de hospederos mamíferos o aviáres se llevó a cabo amplificando una región del citocromo b utilizando los cebadores Avian Forward (5'-GACTGTGACAAAATCCNTTCCA-3') y Avian Reverse (5'-GGTCTTCATCTYHGGYTTACAAGAC-3') los cuales amplifican un fragmento de 508 pares de bases tanto en mamíferos como aves, y un fragmento de 290 pares de bases en el caso de aves (Cicero y Johnson 2001). Se trabajó con 0.5 μ L de cada cebador (100pmol/ μ L), 12.5 μ L de buffer 2x GoTaq® Green Master Mix (Promega), 2.0 μ L de ADN y 9.5 μ L de agua libre de ADNAsas. El programa de amplificación consistió en 5 minutos a 95°C, seguido por 35 ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 53.4°C y 90 segundos a 72°C, con un último paso de elongación de 4 minutos a 72°C. Los productos de amplificación fueron visualizados en un gel de agarosa al 2% con tinción de bromuro de etidio. La confirmación de las muestras de mamíferos se realizó utilizando los cebadores MamFor (5'-CGAAGCTTGATATGAAAAACCATCGTTG-3') y MamRev (5'-TGTAGTTRTCWGGGTCHCCTA-3'), los cuales amplifican un fragmento de 772 pares de bases (Ngo y Kramer 2003). Se trabajó en las mismas condiciones que el PCR descrito anteriormente, utilizando la temperatura de hibridación a 55°C.

Las muestras que amplificaron para mamíferos fueron analizadas para especie por medio de un PCR multiplex con cebadores específicos para humano (*Homo sapiens*), vaca (*Bos taurus*), perro (*Canis familiaris*) y cabra (*Capra hircus*) (Cuadro 1) (Kent y Norris 2005). Se trabajó con 0.5 μ L de cada cebador (100 pmol/ μ L), 12.5 μ L de buffer 2x GoTaq® Green Master Mix, 2.0 μ L de ADN y 8 μ L de agua libre de ADNAsas. El programa de amplificación consistió en 5 minutos

a 95°C, seguido por 30 ciclos de 1 minuto a 95°C, 1 minuto a 57°C y 1 minuto a 72°C, con un paso final de elongación de 7 minutos a 72°C. Los productos de amplificación fueron visualizados en un gel de agarosa al 2% con tinción de bromuro de etidio.

Cuadro 2. Cebadores específicos para especies de vertebrados

Cebador	Secuencia	Tamaño del producto
Human741F	5'-GGCTTACTTCTCTTCATTCTCTCCT-3'	334
Goat894F	5'-CCTAATCTTAGTACTTGTACCCTTCCTC-3'	132
Dog368F	5'-GGAATTGTACTATTATTCGCAACCAT-3'	680
Cow121F	5'-CATCGGCACAAATTTAGTCG-3'	561
UNREV1025	5'-GGTTGTCCTCCAATTCATGTTA-3'	

(Kent y Norris 2005)

Para determinar si las muestras que no mostraron amplificación en el PCR multiplex descrito anteriormente provenían de cerdos (*Sus scrofa*) se utilizaron los cebadores PIG573F (5'-CCTCGCAGCCGTACATCTC-3') y UNREV1025 (5'-GGTTGTCCTCCAATTCATGTTA-3') los cuales amplifican un fragmento de alrededor de 453 pares de bases (Kent y Norris 2005). Se trabajó con 0.5 µL de cada cebador (100 pmol/µL), 12.5 µL de 2x GoTaq® Green Master Mix, 2.0 µL de ADN y 9.5 µL de agua libre de ADNAsas. Se utilizó el mismo programa de amplificación descrito en el PCR anterior y los productos se visualizaron en un gel de agarosa al 2% con tinción de bromuro de etidio.

Finalmente, las muestras que amplificaron para aves fueron analizadas para identificar *Gallus gallus*, utilizando los cebadores específicos Chick1123R (5'-GAAGAGGATAAGT AGGATGGTGAAG-3') y UNFOR1029 (5'-TAACCTGAATCGGAAGCCAACC-3') los cuales amplifican para un producto de alrededor de 95 pares de bases (Kent *et al.* 2007). Se trabajó con 0.5 µL de cada cebador (100 pmol/µL), 12.5 µL de 2x GoTaq® Green Master Mix, 2.0 µL de ADN y 9.5 µL de agua libre de ADNAsas. El programa de amplificación consistió de un primer paso de 5 minutos a 95°C, seguido de 30 ciclos de un minuto a 95°C, un minuto a 58°C y un minuto a 72°C, con un paso final de extensión de 7 minutos a 72°C. Los productos de amplificación se visualizaron en un gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio.

B. Análisis de resultados

Se calculó el porcentaje de ingestas provenientes de cada hospedero. Para cada hospedero identificado, en donde el número de ingestas identificadas fue igual o mayor a cinco, se calculó el intervalo de confianza al 95% utilizando la fórmula $95\%IC = \pm 1.96 \times \sqrt{(p(1-p)/n)}$, donde **p** representa el número de ingestas identificadas del hospedero específico y **n** el total de ingestas identificadas (Apperson *et al.* 2004).

Para comprobar si existía una diferencia entre la cantidad de zancudos colectados en los distintos tipos de trampa dependiendo del esfuerzo de colecta (mensual o colecta adicional “blitz”) se realizó una prueba de comparaciones múltiples con una tabla de contingencia utilizando la prueba exacta de Fischer. De la misma manera se compararon las ingestas provenientes de aves y mamíferos de los cuadrantes 1 y 2. Para observar si existía una diferencia significativa entre las ingestas provenientes de hospederos mamíferos, aviáres y otros vertebrados en 2007 y 2008, se utilizó una tabla de contingencia y la prueba de χ^2 . De la misma manera se compararon los hospederos identificados por cuatrimestre. Las pruebas estadísticas se realizaron utilizando el programa GraphPad Prism 5.0 para Mac OS X y en todos los casos se trabajó con un nivel de confianza del 95%.

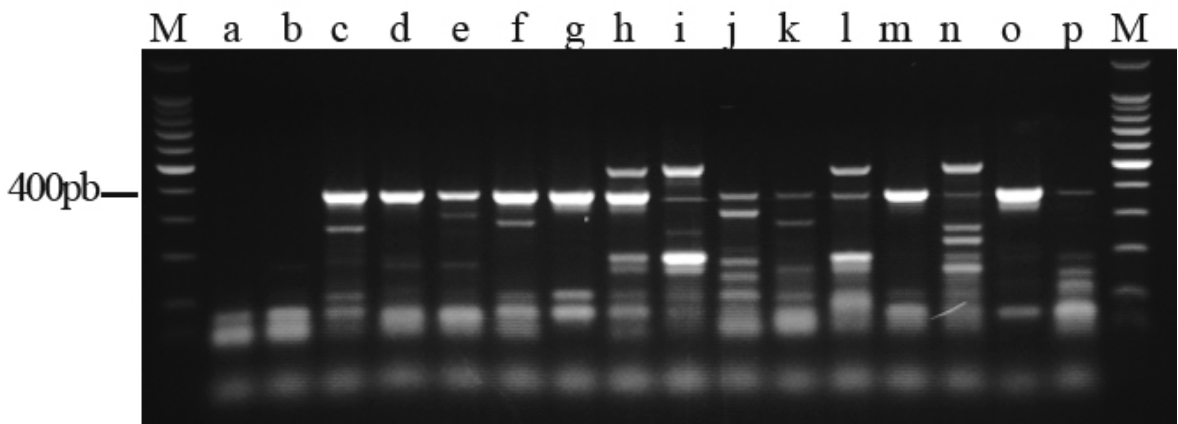
Se calculó el índice de diversidad (índice de variabilidad) D, el cual viene dado por la fórmula $D = 1 - \sum p_i^2$, donde **p** es la proporción de individuos en cada categoría y **N** es el número total de categorías (Gibbs y Martin 1962). Se realizó una correlación de Spearman (ρ) entre el índice de diversidad y la densidad de zancudos para observar si existe una relación entre la cantidad de zancudos y la diversidad de hospederos identificados.

III. RESULTADOS

1. Colecta y procesamiento de muestras. Se procesaron un total de 307 hembras de *Cx. taeniopus* alimentadas (provenientes de 55 lotes) colectadas de 2007 a 2008. El 69% de los zancudos fueron colectados en 2007 y el 31% en 2008. El 99% de los zancudos colectados provenían de áreas rurales (cuadrantes 1, 2, 7 y 8) y el 1% restante de áreas no rurales (cuadrantes 5, 6 y 10). El 71.7% de los zancudos fueron colectados con trampas CDC de luz y el 2.3% con trampas grávidas. El resto de los zancudos fue colectado cuando se aumentó el esfuerzo de captura debido a una seroconversión del VON en gallinas centinelas (25.7% con trampas CDC de luz y 0.3% con trampas grávidas). Al comparar la cantidad de zancudos colectados en las distintas trampas durante las colectas normales y cuando se aumento el esfuerzo de captura, se observó que no existe una diferencia significativa al realizar colectas mensuales o colectas “blitz” adicionales con respecto al tipo de trampa ($p=0.69$).

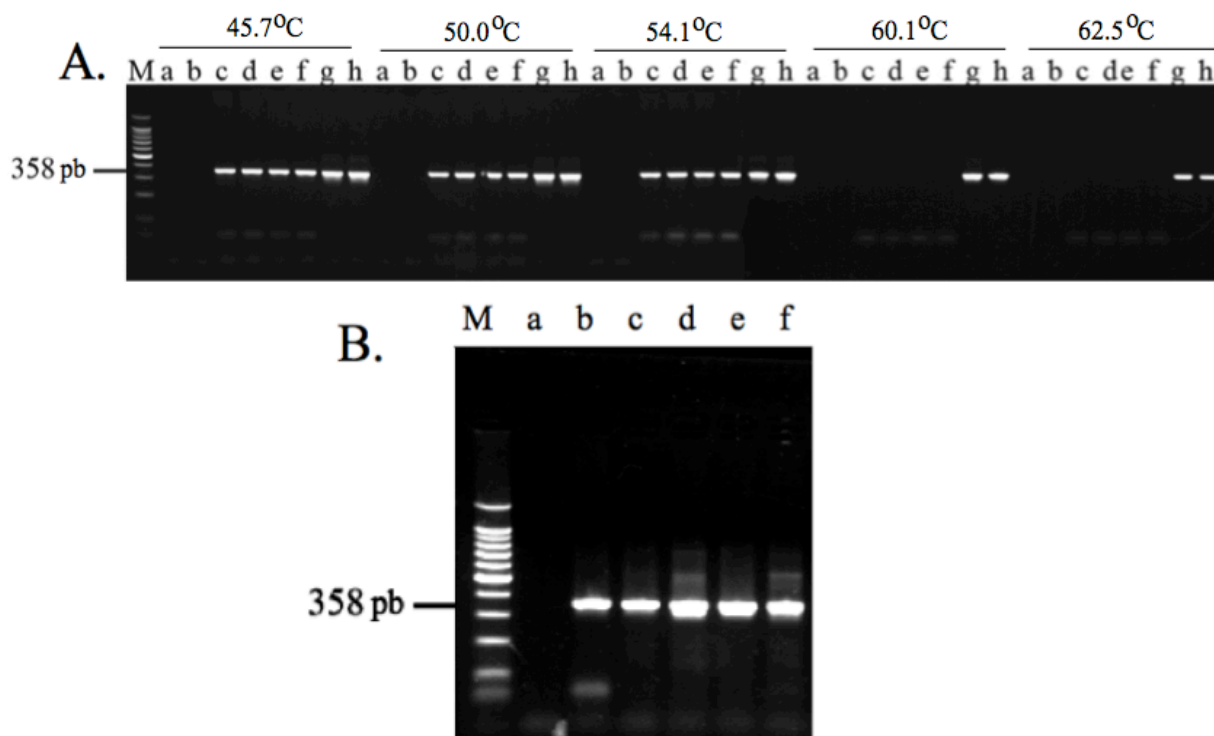
2. Extracción de ADN. Se realizaron un total de 14 extracciones de ADN, cada una con 23 abdómenes individuales y un control negativo. Se comprobó la calidad del ADN extraído (Figura 4) al realizar un PCR para la amplificación de un fragmento de la NADH 4 deshidrogenasa del genoma mitocondrial del zancudo. Para todas las extracciones se observó el producto esperado de alrededor de 400 pares de bases, indicando que la extracción fue exitosa.

Figura 4. Verificación de la calidad del ADN extraído por medio de PCR ND4. (a) y (b) corresponde al control negativo sin templado, (c)-(p) ADN obtenido de los abdómenes de zancudos alimentados. En todas las muestras se observa el producto esperado de 400 pares de bases



3. Ensayos para la identificación de hospederos. Se realizó la optimización del PCR para identificar hospederos vertebrados basado en la amplificación de un fragmento del citocromo b mitocondrial. Para esto se realizó un PCR con gradiente de temperatura de hibridación (Figura 5A). Se trabajó con controles de ADN de ave y de mamífero. En el caso de los controles de ave, se trabajó con controles frescos y controles que habían pasado por varios ciclos de congelación-descongelación para observar si aún podía obtenerse amplificación a partir de estas muestras. Con base a la amplificación observada, se seleccionó la temperatura de hibridación de 50°C, en la que todas las muestras mostraban amplificación visible. Una vez realizado el PCR con la temperatura elegida, se observó la misma amplificación para todos los animales probados (Figura 5B).

Figura 5. Optimización del PCR para la identificación de vertebrados utilizando los cebadores BM1 y BM2. A) Gradiente de temperatura donde (a)-(b) corresponde al control negativo sin templado, (c)-(d) ave (gallina), (e)-(f) ave (gallina tras varios ciclos de descongelación), (g)-(h) cabra. B) Amplificación para ave y distintos mamíferos (a) control negativo sin templado (b) gallina, (c) vaca, (d) cabra, (e) humano y (f) perro



En total, las ingestas de 262 zancudos fueron identificadas como provenientes de un hospedero vertebrado (85.3%), de estas el 31.3% provenían de aves (n=82) y el 28.2% de

mamíferos (n=74). El 40.5% restante (n=106) no fue identificado a nivel de clase. El 14.7% de los zancudos probados no mostró amplificación por lo que su hospedero no pudo ser identificado.

Entre las aves, el hospedero más común fue la gallina (86.6% de las aves, n=71). Entre los mamíferos, los hospederos más comunes fueron el perro (32.4%, n=24) y la vaca (28.4%, n=21). Además, se obtuvo una muestra proveniente de humano (año 2007, cuadrante 2) y no se identificó ninguna proveniente de cerdo.

Cuadro 3. Ingestas identificadas de zancudos *Cx. taeniopus* colectados en Puerto Barrios, Izabal de 2007 a 2008.

Hospedero	No. Individuos	% Orden	% Total (\pm IC)
Gallina (<i>Gallus gallus</i>)	71	86.6	27.1 (\pm 5.4)
Otras aves ¹	11	13.4	4.2 (\pm 2.4)
Total aves	82		31.3 (\pm 5.61)
Perro (<i>Canis familiaris</i>)	24	32.4	9.2 (\pm 3.5)
Vaca (<i>Bos taurus</i>)	21	28.5	8.0 (\pm 3.3)
Humano (<i>Homo sapiens</i>)	1	1.3	0.4
Otros mamíferos ²	28	37.8	10.7 (\pm 3.7)
Total Mamíferos	74		28.2 (\pm 5.4)
Otros vertebrados ³	106		40.5 (\pm 5.9)
No identificados	45		
Total de individuos	307		

¹Aves identificadas a nivel de clase

²Mamíferos identificados a nivel de clase

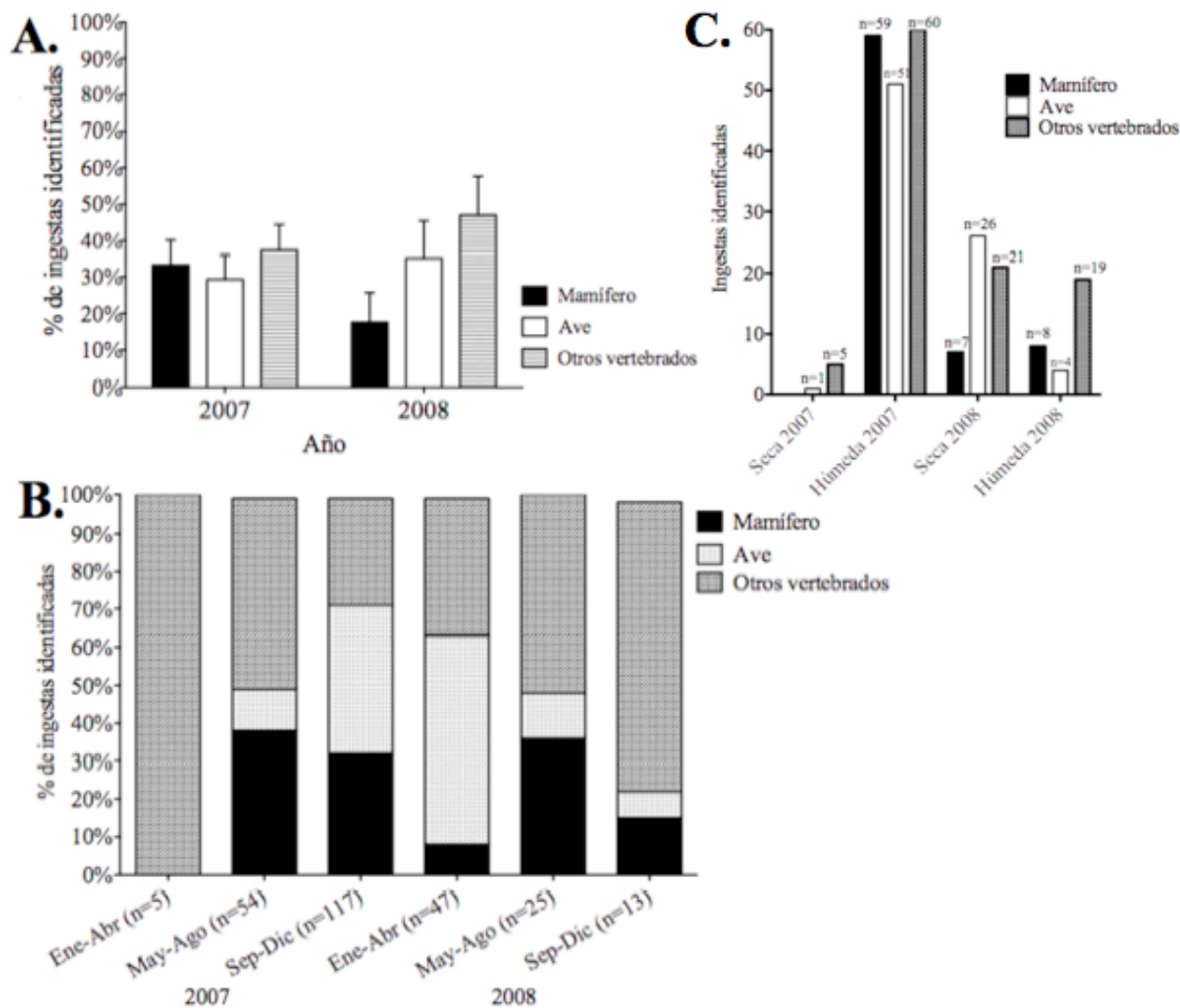
³Vertebrados que no fueron identificados a nivel de clase

4. Patrones de alimentación de *Cx. taeniopus*. Al comparar las ingestas provenientes de hospederos mamíferos y aviares en los años 2007 y 2008 se observó que existe una diferencia significativa entre los hospederos identificados cada año ($\chi^2=7.00$, gl=2, $p<0.05$), aumentando la cantidad de aves identificadas en 2008 (Figura 6A).

De igual manera, al comparar los hospederos identificados cuatrimestralmente (Figura 6B), se observó que estos varían significativamente a lo largo de los dos años ($\chi^2=52.24$, gl=10, $p<0.0001$). Al comparar los hospederos identificados en la época seca (enero a junio, precipitación media=194.5 mm, humedad relativa=78.9%) y en la época húmeda (julio a

diciembre, precipitación media=335.4 mm, humedad relativa=80.75%), se observó que existe una diferencia significativa ($\chi^2=24.66$, $gl=6$, $p<0.05$).

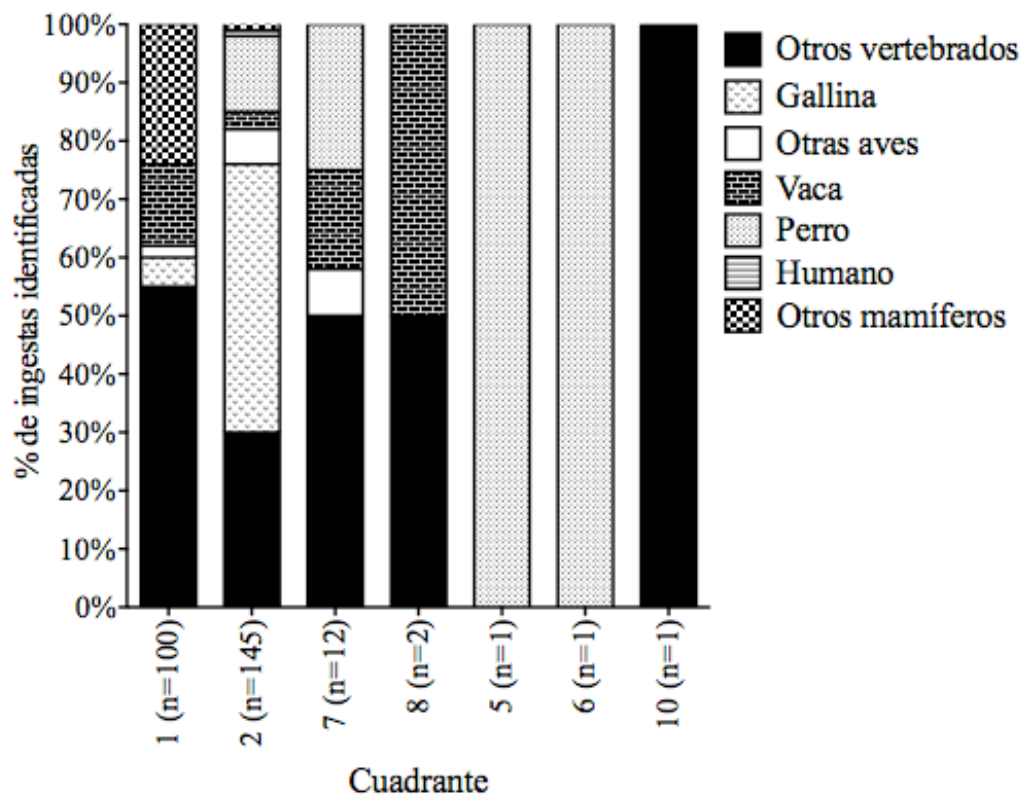
Figura 6. Ingestas identificadas de zancudos *Cx. taeniopus* en Puerto Barrios en los años 2007 y 2008. A) Comparación entre las ingestas provenientes de mamíferos y aves en los años 2007 y 2008 (Prueba de χ^2 , $p<0.05$). B) Proporción de ingestas provenientes de distintos hospederos cuatrimestralmente (Prueba de χ^2 , $p<0.0001$). C) . Comparación entre las ingestas identificadas de zancudos *Cx. taeniopus* en Puerto Barrios en los años 2007 y 2008 durante la época seca y húmeda (Prueba de χ^2 , $p<0.05$). La época seca comprende de enero a junio y la época lluviosa comprende de julio a diciembre



Se compararon las proporciones de hospederos provenientes de los distintos cuadrantes (Figura 7). Al comparar los dos cuadrantes rurales con el mayor número de hospederos identificados (cuadrante 1 y 2), se observó que existe una diferencia significativa entre los resultados y que en el cuadrante 1 se identificó una mayor cantidad de aves que en el

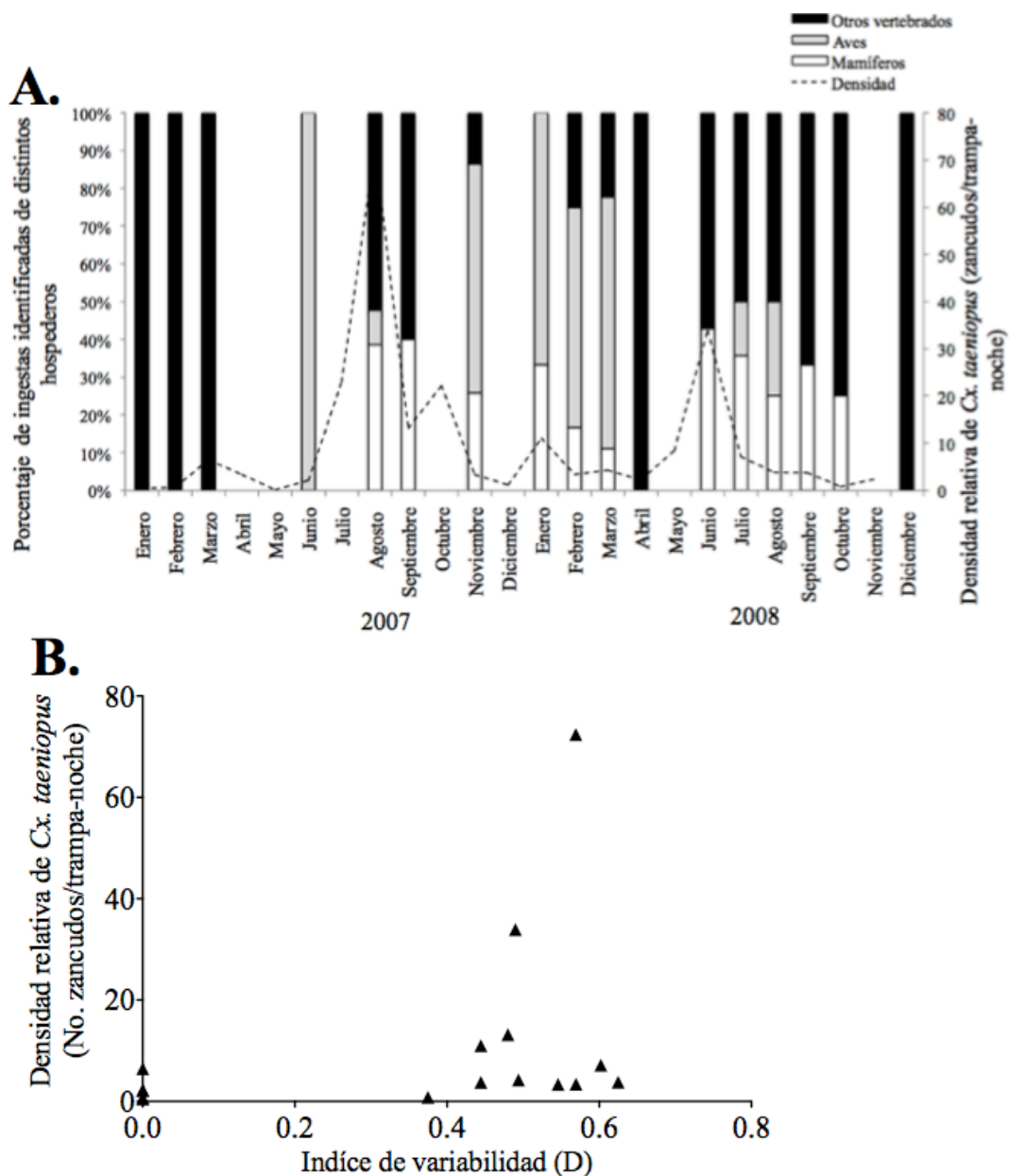
cuadrante 2 ($p < 0.0001$). Esta comparación no se realizó para los demás cuadrantes debido a que se contaba con un número limitado ingestas identificadas ($1 < n < 12$).

Figura 7. Proporciones de ingestas identificadas de zancudos *Cx. taeniopus* en Puerto Barrios en los distintos cuadrantes. Los cuadrantes 1, 2, 7 y 8 son considerados como cuadrantes rurales y el 5, 6 y 10 como cuadrantes no rurales. “Otros mamíferos” corresponde a los mamíferos que no mostraron amplificación para las especies probadas. “Otras aves” corresponde a las aves que no mostraron amplificación para gallina. “Otros vertebrados” corresponde a aquellos que no fueron identificados a nivel de orden.



En el caso de los meses en los que se identificaron hospederos de los cuales se alimentaron los zancudos, se calculó el índice de diversidad de hospederos identificados y se comparó con la densidad relativa de *Cx. taeniopus*, para observar si existía una correlación entre la diversidad de hospederos identificados y la densidad de zancudos (Figura 8A y B). Se observó que estos valores se encuentran relacionados ($\rho = 0.03$, $p = 0.03$), y que a mayor densidad de zancudos las ingestas identificadas son más heterogéneas.

Figura 8. Relación entre la variabilidad de hospederos identificados y la densidad de zancudos *Cx. taeniopus*. A) Densidad de *Cx. taeniopus* y proporciones de hospederos identificados cada mes B) Correlación entre el índice de variabilidad de hospederos identificados y la densidad relativa de *Cx. taeniopus*. Un valor de D cercano a 1 indica que la población es heterogénea. ($\rho=0.53$, $p=0.03$)



IV. DISCUSIÓN

Este trabajo tenía como objetivo identificar los patrones de alimentación del zancudo *Culex (Melanoconion) taeniopus* en el municipio de Puerto Barrios, Izabal durante los años 2007 y 2008. Esto es de gran importancia ya que como se mencionó, estos zancudos se han visto relacionados con numerosos arbovirus, como alfavirus, bunyavirus y flavivirus. Conocer los patrones de alimentación de estos zancudos puede brindar información sobre como se comportan estos virus en nuestro país y los potenciales hospederos que pueden estar involucrados en los ciclos de transmisión de estos.

1. Colecta y procesamiento de las muestras. Es importante mencionar que este estudio no contó con un diseño experimental estructurado ya que se trabajó con muestras colectadas retrospectivamente. Debido al pequeño número de muestra, se incluyeron tanto los zancudos colectados mensualmente como aquellos colectados cuando se aumento el esfuerzo de captura debido a una seroconversión del VON en gallinas centinelas, por lo que las colectas no fueron homogéneas. Es importante mencionar sin embargo, que el realizar colectas mensuales o colectas adicionales no afecta la proporción de zancudos que se colecta por cada tipo de trampa.

Con respecto a los zancudos colectados en las distintas trampas, se sabe que las trampas grávidas atraen a las hembras alimentadas que buscan donde poner sus huevos, mientras que las trampas CDC de luz atraen a hembras que buscan alimentarse. Hubiera sido de esperarse obtener una mayor cantidad de zancudos alimentados colectados con trampas grávidas, sin embargo se obtuvieron más con trampas CDC de luz. Esto contrasta con estudios realizados en Texas, dónde se observó una mayor cantidad de zancudos *Culex* y *Aedes* colectados con trampas grávidas. Sin embargo, resultados del mismo estudio sugieren que las trampas CDC de luz colectan una mayor cantidad de especies de zancudos (White *et al.* 2009). Es posible que *Cx. taeniopus* se encuentre entre el grupo de especies alimentadas que son colectadas por las trampas CDC de luz.

2. Extracción de ADN. La extracción del ADN fue realizada utilizando un kit de extracción de ARN, el cual, según las indicaciones del fabricante, coextrae ambos ácidos nucleicos. Como se puede observar, la extracción fue exitosa ya que se observó amplificación del fragmento del gen de la enzima NADH 4 deshidrogenasa del zancudo. Estos cebadores fueron diseñados para estudiar poblaciones de zancudos y se trata de cebadores degenerados, lo que puede explicar los polimorfismos observados. La coextracción de ácidos nucleicos brinda una

ventaja al momento de procesar las muestras, ya que es posible realizar una sola extracción para identificar la fuente de la ingesta sanguínea, así como para posteriores estudios de identificación de ARN viral. Sin embargo, hay que tener en consideración que los ácidos nucleicos son sensibles a los cambios de temperatura, por lo que se recomienda realizar varias alícuotas y así evitar varios ciclos de congelación y descongelación. Otro factor a tener en cuenta es que un resultado positivo para ácido nucleico viral proveniente de las muestras de los abdómenes no es definitivo ya que el virus podría encontrarse en la sangre ingerida y no en el zancudo. Es por esto que estos resultados deben confirmarse con la extracción de ARN del resto del zancudo (cabeza, tórax y patas) para observar si ha ocurrido diseminación.

3. Ensayos para la identificación de hospederos. Debido a la implementación de una metodología para identificar vertebrados, fue posible tener un porcentaje alto de ingestas identificadas. Esto es atribuible a que el PCR optimizado es un método robusto debido a que se dirige a una región conservada del *cyt b*. Las ingestas que no se lograron identificar podrían atribuirse a aquellos zancudos que no presentaban una ingesta visible, por lo que la cantidad de ADN extraído no fue suficiente. Por otro lado, se observó que una gran cantidad de las ingestas que no se lograron identificar provenían de especímenes secos, lo que sugiere que es preferible utilizar otros métodos de almacenamiento, como la refrigeración, principalmente si se piensa almacenar los especímenes por un tiempo largo.

El utilizar un tamizaje inicial para identificar vertebrados presenta varias ventajas. La primera es que es posible identificar a un rango amplio de hospederos. Además, permite descartar aquellas muestras que no presentaron una amplificación inicial con lo que se ahorran recursos. Por último, se ha demostrado que el producto de PCR amplificado con estos cebadores puede ser posteriormente secuenciado para obtener la identidad de aquellos hospederos que no pudiesen ser identificados a nivel de orden o especie.

En cuanto a los hospederos mamíferos identificados, se observó la importancia de utilizar otro par de cebadores para llevar a cabo la confirmación de estos. Inicialmente la cantidad de mamíferos identificados con el primer par de cebadores fue mayor. Sin embargo, una vez realizada la confirmación con los cebadores específicos para mamíferos, esta cantidad disminuyó. Estudios anteriores han demostrado que algunas aves pueden mostrar amplificación similar a los mamíferos, como es el caso de algunos zanates (*Quiscalus mexicanus*) (González-Reiche comunicación personal). Esto puede deberse a que los cebadores no fueron probados para todas

las especies de posibles hospederos que se pueden encontrar. Alrededor de una tercera parte de las ingestas provenientes de mamíferos no pudieron ser identificadas a nivel de especie, lo que sugiere la necesidad de diseñar nuevos cebadores para otros animales comunes de la región de estudio.

Una de las limitaciones con las que se contó fue que no se trabajó con cebadores dirigidos a reptiles y anfibios. Sin embargo, es probable que aquellas ingestas que no fueron identificadas a nivel de clase taxonómica provengan de estos. Dado a que se ha observado que *Cx. taeniopus* se alimenta de reptiles, sería de importancia implementar una metodología para identificar estos a nivel de clase. Además, se ha demostrado que los reptiles y anfibios pueden jugar un papel importante en los ciclos de amplificación de arbovirus, como en el caso del EEE (Hayes *et al.* 1964), por lo que su identificación sería importante.

La mayoría de zancudos alimentados colectados provenían de las áreas rurales. Es importante mencionar que en estas áreas habitan animales domésticos que no se encuentran en las áreas no rurales, como es el caso de ganado y equinos. Además, en estas áreas habita una mayor cantidad de animales silvestres. Esto podría tener alguna relación con los patrones de alimentación de estos zancudos, ya que se ha observado que estos se alimentan de roedores, como ratas, ratones y marsupiales dideformos (Cupp *et al.* 1986), los cuales pueden ser hospederos reservorios de arbovirus potencialmente transmitidos por estos vectores. De igual manera, los equinos están involucrados en los ciclos epizooticos de ciertos arbovirus, principalmente VEEV y VON. La presencia de estos animales silvestres y equinos podría explicar por que *Cx. taeniopus* se colecta en mayores cantidades en las áreas rurales. No se identificó ninguna ingesta proveniente de roedor ni equino debido a que no se contaba con cebadores para esto. Es posible que en el porcentaje de mamíferos sin identificar se encuentren equinos o roedores, por lo que se recomienda identificar en un futuro estas muestras utilizando distintas técnicas moleculares como la secuenciación o el diseño de cebadores específicos.

En este estudio no se identificaron ingestas mixtas. Sin embargo, la única forma de identificarlas era por medio del PCR multiplex para mamíferos, el cual tiene esta capacidad (Kent y Norris 2005). Es importante mencionar que otros estudios han observado limitaciones técnicas al utilizar metodologías de PCR múltiplex lo que impide la identificación de ingestas múltiples, por lo que sería necesario analizar estos factores en estudios posteriores. La identificación de ingestas mixtas es de gran importancia ya que estas incrementan el riesgo del vector de adquirir o

transmitir un arbovirus al aumentar las posibilidades de tener contacto con hospederos competentes (Anderson y Brust 1995). Aún cuando muchos arbovirus requieren un ciclo de replicación dentro del vector, se ha observado que en algunos casos puede ocurrir transmisión horizontal en la que el vector es capaz de transmitir el virus directamente de un hospedero a otro. Se sugiere implementar otras técnicas moleculares, como clonación y secuenciación, que puedan llevar a cabo la identificación de ingestas múltiples

4. Patrones de alimentación de *Cx. taeniopus*. Estudios han demostrado que cuando las colectas se realizan en un solo sitio de estudio, los patrones de alimentación de los zancudos son aleatorios. Esto se debe a que los hábitats pequeños ofrecen recursos limitados. Sin embargo, esta barrera se elimina al muestrear en distintos sitios (Chaves *et al.* 2010).

Pocos estudios se han realizado sobre los patrones de alimentación de *Cx. taeniopus*, sin embargo, se ha podido observar que se alimenta de mamíferos, aves, reptiles y anfibios (Cupp *et al.* 1989). Entre los mamíferos se ha observado que sus preferidos son los bovinos, lo que contrasta con los resultados de este estudio, donde se observó que entre los hospederos mamíferos identificados a nivel de especie el preferido era el perro. Sin embargo, los bovinos siguieron al perro en cuanto a porcentaje. En cuanto a los humanos, el porcentaje obtenido en el estudio concuerda con el porcentaje reportado en la literatura, de alrededor de 0.3% de ingestas identificadas provenientes de humano. Esto sugiere que *Cx. taeniopus* podría no tener una tendencia antropofílica. Sin embargo, sería importante realizar colectas intradomiciliares para observar si este patrón cambia dentro de las casas.

Se ha sugerido que *Cx. taeniopus* puede tener un comportamiento oportunista. Los resultados obtenidos en este estudio indican que *Cx. taeniopus* podría alimentarse de una forma oportunista en la región de estudio. Sin embargo, para determinar esto es necesario contar con datos de disponibilidad de los hospederos de los cuales se alimenta (*i.e.* censos). Esta es una de las limitaciones de los estudios sobre patrones de alimentación de insectos hematófagos, ya que obtener esta información de una forma sistematizada requiere tiempo y un diseño que permita obtener el máximo de información posible. Una vez se obtiene esta información, es posible obtener índices de alimentación, los cuales permiten comparar las preferencias hacia ciertos hospederos y establecer si realmente se trata de una preferencia o si se está aprovechando la abundancia de estos (Kay *et al.* 1979). Se recomienda diseñar métodos para coleccionar esta información en futuros estudios similares.

Los valores de las pruebas estadísticas indican que los patrones de alimentación variaron entre 2007 y 2008, aumentando el número de aves en 2008. Esto puede deberse a cambios de la densidad de hospederos o variación estacional en las poblaciones de zancudos (e.g., univoltinos, bivoltinos, multivoltinos) o efectos de la zona de convergencia intertropical (el niño). Sin embargo, como ya se mencionó, es necesario contar con información a cerca de las poblaciones de hospederos en la región de estudio para poder explicar estas observaciones. Esta variación también podrían deberse a cambios en los factores ambientales o del hábitat. Con respecto a la estacionalidad, se observó que los zancudos cambian sus patrones de alimentación con respecto a la estación seca y húmeda. Esto podría deberse a varios factores como las migraciones de las aves o cambios en el comportamiento de los animales relacionados con la lluvia (*i.e.* algunos animales buscan donde cubrirse de la lluvia o se agrupan).

Se ha observado que la presencia de algunas especies abundantes pueden distraer a los zancudos en busca de un hospedero del cual alimentarse, haciendo que no se alimenten de hospederos alternativos (Kent *et al.* 2009). Esto podría ser lo que ocurre en los cuadrantes rurales con más cantidad de ingestas identificadas (cuadrante 1 y 2). En este caso se rechazó la hipótesis nula. Como se mencionó anteriormente, se obtuvo una mayor cantidad de ingestas provenientes de aves en el cuadrante 2, siendo la mayoría provenientes de gallinas. Aún cuando estos dos cuadrantes se encuentran próximos (Figura 2), se ha observado que en el cuadrante 2 hay más gallinas. Al haber mayor disponibilidad de gallinas, es probable que los zancudos aprovechen esto y no se alimenten de otros hospederos (mamíferos y otros vertebrados).

Es posible observar que a mayor densidad relativa de *Cx. taeniopus*, la fuente de alimentación identificada es más variada. Esto podría asociarse a varios factores. Al aumentar la densidad de zancudos, los hospederos toman estrategias defensivas, lo que hace que los zancudos busquen otros hospederos de quienes alimentarse (Nelson *et al.* 1976). Además, al tener una mayor cantidad de muestras (zancudos), es posible identificar una mayor cantidad de hospederos. Es importante mencionar que en este estudio hubieron meses en los que no se colectaron zancudos alimentados o se colectaron muy pocos (1 o 2). Esto es una limitación ya que no se pueden comparar los resultados longitudinalmente si no se cuenta con muestras de tamaño homogéneo. Para evitar esto podrían hacerse submuestras de cada mes (García-Rejon *et al.* 2010), para procurar que todos los meses se trabaje con la misma cantidad de zancudos. Sin

embargo, esto aplicaría para los zancudos que se capturan en cantidades más abundantes (*Culex quinquefasciatus*, *Culex nigripalpus*).

V. CONCLUSIONES

- A. Los zancudos *Cx. taeniopus* colectados en el municipio de Puerto Barrios, Departamento de Izabal durante 2007 y 2008 se alimentan de aves, mamíferos y otros vertebrados.
- B. Dentro de las aves, los zancudos *Cx. taeniopus* colectados en el municipio de Puerto Barrios, Departamento de Izabal durante 2007 y 2008, se alimentan principalmente de gallinas.
- C. Dentro de los mamíferos, los zancudos *Cx. taeniopus* colectados en el municipio de Puerto Barrios, Departamento de Izabal durante 2007 y 2008, se alimentan principalmente de perros y vacas.
- D. Los zancudos *Cx. taeniopus* colectados en el municipio de Puerto Barrios, departamento de Izabal durante 2007 y 2008 se alimentan en un 0.4% de humanos.
- E. Los zancudos *Cx. taeniopus* colectados en el municipio de Puerto Barrios, departamento de Izabal, mostraron un cambio en sus patrones de alimentación de 2007 a 2008.
- F. Los patrones de alimentación de *Cx. taeniopus* colectados en el municipio de Puerto Barrios, departamento de Izabal durante 2007 y 2008 muestran estacionalidad.
- G. Dentro de los cuadrantes rurales, los zancudos *Cx. taeniopus* colectados en el municipio de Puerto Barrios, departamento de Izabal durante 2007 y 2008, mostraron distintos patrones de alimentación.
- H. Al aumentar la densidad relativa de zancudos *Cx. taeniopus* colectados en el municipio de Puerto Barrios, departamento de Izabal durante 2007 y 2008, se identifica una mayor variedad de hospederos.

VI. RECOMENDACIONES

- A. Se recomienda llevar a cabo la identificación de las ingestas no identificadas por medio de otros métodos moleculares, como secuenciación.
- B. Diseñar o implementar cebadores para la identificación de reptiles y anfibios a nivel de orden.
- C. Se sugiere el diseño o implementación de cebadores para la identificación de otras especies de vertebrados importantes en la región de estudio.
- D. Se recomienda la revisión o implementación de técnicas que permitan la detección de ingestas múltiples.
- E. Se recomienda realizar censos o encuestas para conocer el tamaño de las poblaciones de hospederos, para un posterior uso de herramientas de análisis de datos (*i.e.* índices de alimentación) que permitan conocer las preferencias de alimentación de los zancudos.
- F. Se recomienda realizar colectas intradomiciliares para capturar *Cx. taeniopus* que pudieran haberse alimentado de humanos.
- G. Llevar a cabo estudios de competencia vectorial para *Cx. taeniopus* de Guatemala para observar si estos pueden transmitir arbovirus (bunyavirus, alfavirus y flavivirus).
- H. Se recomienda estudiar los patrones de alimentación de otros zancudos potencialmente implicados en la transmisión de arbovirus en Guatemala.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbasi, I.; Cunio, R. y A. Warburg. 2008. Identification of blood meals imbibed by phlebotomine sand flies using cytochrome b PCR and reverse line blotting. *Vector Borne and Zoonotic Diseases*.
- Aitken, T.H.G.; Downs, W.G.; Spence, L. y A.H. Jonkers. 1964. St. Louis encephalitis virus isolations in Trinidad, West Indies, 1953-1962. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 13(3): 450-451
- Allan, S.A.; Bernier, U.R. y D.L. Kline. 2006. Laboratory evaluation of avian odors for mosquito (Diptera: Culicidae) attraction. *Journal of Medical Entomology* 43(2): 225-231
- Anderson, R.A. y R.A. Brust. 1995. Field evidence for multiple host contacts during blood feeding by *Culex tarsalis*, *Cx. restuans*, and *Cx. nigripalpus* (Diptera: Culicidae). *Journal of Medical Entomology* 32(5):705-710
- Apperson, C.S.; Hassan, H.K.; Harrison, B.A.; Savage, H.M.; Aspen, S.E.; Farajollahi, A.; Crans, W.; Daniels, T.J. Falco, R.C.; Benedict, M.; Anderson, M.; McMillen, L. y T.R. Unnasch. 2004. Host feeding patterns of established and potential mosquito vectors of west Nile virus in the Eastern United States. *Vector borne and zoonotic diseases* 4(1): 71-82
- Barrera, R.; Ferro, C.; Navarro, J.C.; Freier, J.; Liria, J.; Salas, R.; Ahumada, M.; Vasquez, C.; González, M.; Kang, W.; Boshell, J. y S.C. Weaver. 2002. Contrasting sylvatic foci of venezuelan equine encephalitis virus in northern South America. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 67: 324-334
- Bartlett-Healy, K.; Crans, W. y R. Gaugler. 2008. Phonotaxis to amphibian vocalizations in *Culex territans* (Diptera: Culicidae). *Annals of The Entomological Society of America* 101(1):95-103
- Belkin, J.N. 1969. The problema of the identity of th especies of *Culex (Melanoconion)* related to *opisthopus*. *Mosquito Systematics Newsletter* 1: 26-28
- Bidlingmayer, W.L. 1967. A comparison of trapping methods for adult mosquitoes: species response and environmental influence. *Journal of Medical Entomology* 4: 200-220

- Boore, J.L. 1999. Animal mitochondrial genomes. *Nucleic Acids Research* 2(8):1767-1780
- Brown, W.M.; George, M. y A.C. Wilson. 1979. Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. *Proceedings of the Natural Academy of Science* 76(4): 1967-1971
- Bull, C.G. y W.V. King. 1923. The identification of the bloodmeal of mosquitoes by means of the precipitin test. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 3: 491-493
- Burkett-Cadena, N.D.; Eubanks, M.D. y T.R. Unnasch. 2008. Preferences of female mosquitoes for natural and artificial resting sites. *Journal of the American Mosquito Control Association* 24(2): 228-235
- Cann, R.L.; Brown, W.M. y A.C. Wilson. 1984. Polymorphic sites and the mechanism of evolution in human mitochondrial DNA. *Genetics* 106:479-499
- CDC. 2008. *Anopheles* mosquitoes [web en línea] en <<http://www.cdc.gov/malaria/biology/mosquito/>>[con acceso el 14 de enero de 2010]
- Chamberlain, R.W.; Sudia, W.D.; Coleman, P.H. y T.H. Work. 1964. Venezuelan equine encephalitis virus from south Florida. *Science* 145(362): 3272-3274
- Chaves, L.F.; Harrington, L.C.; Keogh, C.L.; Nguyen, A.M. y U.D. Kitron. 2010. Blood feeding patterns of mosquitoes: random or structured?. *Frontiers in Zoology* 7(3): 1-11
- Cicero, C. y N.K. Johnson. 2001. Higher-level phylogeny of new world vireos (aves: vireonidae) based on sequences of multiple mitochondrial DNA genes. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 20(1): 27-40
- Cupp, E.W.; Scherer, W.F.; Lok, J.B.; Brenner, R.J. Dziem, G.M. y J.V. Ordoñez. 1986. Entomological studies at an enzootic venezuelan equine encephalitis virus focus in Guatemala, 1977-1980. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 35(4): 851-859
- ; Kreutzer, R.D. y S.C. Weaver. 1989. The Biosystematics of *Culex (Melanoconion) taeniopus* sensu lato in relation to venezuelan equine encephalomyelitis. *Mosquito Systematics* 21: 216-221
- Daniel, W.W. 2002. *Bioestadística: base para el análisis de las ciencias de la salud*. Limusa Wiley. 4ª ed. México. 755 págs.

- Davies, J.B. 1975. Moonlight and the biting activity of *Culex (Melanoconion) portesi* Senevet & Abonnec and *C. (M.) taeniopus* D. & K. (Diptera, Culicidae) in Trinidad forests. *Bulletin of Entomological Research* 68: 81-96
- Day, J.F. 2005. Host-seeking strategies of mosquito disease vectors. *Journal of the American Mosquito Control Association* 21(4): 17-22
- Dekker, T.; Geier, M. y R.T. Cardé. 2008. Carbon dioxide instantly sensitizes female yellow fever mosquitoes to human skin odours. *The Journal of Experimental Biology* 208: 2963-2972
- Elizondo-Quiroga, A.; Flores-Suarez, A.; Elizondo-Quiroga, D.; Ponce-García, G.; Blitvich, B.J.; Contreras-Cordero, J.F.; González-Rojas, J.I.; Mercado-Hernandez, R.; Beaty, B.J. y I. Fernandez-Salas. 2006. Host-feeding preference of *Culex quinquefasciatus* in Monterrey, northeastern Mexico. *Journal of the American Mosquito Control Association* 22(4): 654-661
- El-Sayed, Y.S.; Mohamed, O.I.; Ashry, K.M. y S.M. Abd El-Rahman. 2009. Using species-specific repeat and PCR-RFLP in typing of DNA derived from blood of human and animal species. *Forensic Science Medicine and Pathology* (en prensa)
- Edman, J.D.; Webber, L.A. y H.W. Kale. 1972. Effect of mosquito density on the interrelationship of host behavior and mosquito feeding success. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 21(4): 487-491
- Ferro, C.; Boshel, J.; Moncayo, A.C.; Gonzalez, M.; Ahumada, M.L.; Kang, W. y S.C. Weaver. 2003. Natural enzootic vectors of venezuelan equine encephalitis virus, Magdalena Valley, Colombia. *Emerging Infectious Diseases* 9(1): 49-54
- 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. 1972. Endemic vectors of Venezuelan encephalitis. *Proceedings of workshops-symposium on Venezuelan encephalitis virus, Washington: Pan American Health Organization* 243: 249-253
- Galindo, P. y M.A. Grayson. 1971. *Culex (Melanoconion) aikenii*: natural vector in Panama of endemic venezuelan encephalitis. *Science* 172(983): 594-595

- García-Rejon, J.E.; Bradley, B.J.; Farfan-Ale, J.A.; Loroño-Pino, M.A.; Chi Chim, W.A.; Flores-Flores, L.F., Rosado-Paredes, E.; Baak-Baak, C.; Perez-Mutul, J.; Suarez-Solis, V.; Fernandez-Salas, I. y B.J. Beaty. 2010. Host-feeding preferente of the mosquito *Culex quinquefasciatus*, in Yucatan State, Mexico. *Journal of Insect Science* 10(32): 1-12
- Gibbs, J.P. y W.T. Martin. 1962. Urbanization, technology and division of labor. *American Sociological Review* 27: 667-677
- Gomes, L.A.M.; Duate, R.; Lima, D.C.; Diniz, B.S.; Serrão, M.L. y N. Labarthe. 2001. Comparision between precipitin and ELISA tests in the bloodmeal detection of *Aedes aegypti* (Linnaeus) and *Aedes fluviatilis* (Lutz) mosquitoes experimentally fed on feline, canine and human hosts. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 95(5): 693-695
- González, A.S. 2009. Preferencias de alimentación sanguínea de zancudos *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) en un foco de transmisión de Virus del Oeste del Nilo, Puerto Barrios, Izabal. Tesis de Licenciatura en Bioquímica y Microbiología, Universidad del Valle de Guatemala. Guatemala, 117 pp
- Gorochotegui-Escalante, N.; De Lourdes, M.; Fernandez-Salas, I.; Beaty, B.J. y W.C. Black IV. 2000. Genetic isolation by distance among *Aedes aegypti* populations along the northeastern coast of Mexico. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 62(2):200-209
- Gray, M.W.; Burger, G. y B.F. Lang. 1999. Mitochondrial evolution. *Science* 284: 1476-1481
- Hatefi, Y. 1985. The mitochondrial electron transport and oxidative phosphorylation system. *Annual Review of Biochemistry* 54: 1015-1069
- Hayes, R.O.; Daniels, J.B.; Maxfield, H.K. y R.E. Wheeler. 1964. Field and laboratory studies on Eastern encephalitis in warm- and cold-blooded vertebrate. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 13(4): 595-606
- Hebert, P.D.N.; Cywinska, A.; Ball, S.L. y J.R. deWaard. 2002. Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society* 270: 313-321
- Hess, A.D.; Hayes, R.O. y C.H. Tempelis. 1968. The use of the forage ratio technique in mosquito host preferente Studies. *Mosquito News* 28: 386-389

- Johns, G.C. y Avise, J.C. 1998. A comparative summary of genetic distances in the vertebrates from the mitochondrial cytochrome b gene. *Molecular Biology and Evolution* (15)11: 1481-1489
- Kay, B.H.; P.F.L. Boreham y J.D. Edman. 1979. Application of the "feeding index" concept to studies of mosquito host-feeding patterns. *Mosquito News* 39: 68-72
- Keesing, F.; Holt, R.D. y R.S. Ostfeld. 2006. Effect of species diversity on disease risk. *Ecology Letters* (9)4: 485-498
- Kent, R. 2009. Molecular methods for arthropod blood meal identification and applications to ecological and vector-borne disease studies. *Molecular Ecology Resources* 9(1): 4-18
- ; González Reiche, A.S.; Morales-Betoulle, M.E. y N. Komar. 2009. Host selection of West Nile virus vectos in Puerto Barrios, Guatemala, 2007. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* (en prensa)
- ; Juliusson, L.; Weissmann, M.; Evans, S. y N. Komar. 2009. Seasonal blood-feeding behavoir of *Culex tarsalis* (Diptera: Culicidae) in Weld County, Colorado, 2007. *Journal of Medical Entomology* 46(2): 380-390
- ; Thuma, P.E.; Mharakurwa, S. y D.E. Norris. 2007. Seasonality, blood feeding behavior, and transmisión of *Plasmodium falciparum* by *Anopheles arabiensis* after an extended drought in southern Zambia. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 76(2):267-224
- Kilpatrick, A.M.; Kramer, L.D.; Campbell, S.R.; Alleyne, O.; Dobson, A.P. y P. Daszak. 2005. West Nile virus risk assesment and the bridge vector paradigm. *Emerging Infectious Diseases* 11(3): 425-429
- ; Kramer, L.D.; Jones, M.J.; Marra, P.P. y P. Daszak. 2006. West Nile virus epidemics in North America are driven by shifts in mosquito feeding behavior. *PLoS Biology* 4(4): 606-610
- Kline, D.L.; Wood, J.R. y J.A. Cornell. 1991. Interactive effects of 1-octen-2-ol and carbon dioxide on mosquito (Diptera: Culicidae) surveillance and control. *Journal of Medical Entomology* 28: 254-258
- Kocher, T.D., Thomas, W.K.; Meyer, A.; Edwards, S.V.; Pääbo, S.; Villablanca, F.X. y A.C. Wilson. 1986. Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: Amplification and

- sequencing with conserved primers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of The United States of America* 86: 6196-6200
- LeBeaud, A.D. 2008. Why arboviruses can be neglected tropical diseases. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 2(6): 247
- Lee, J.H.; H. Hassan.; Hill, G.; Cupp, E.W.; Higazi, T.B.; Mitchell, C.J.; Godsey, M.S. y T.R. Unnasch. 2002. Identification of mosquito avian-derived blood meals by polymerase chain reaction-heteroduplex analysis. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 66(5): 599-604
- Lewin, B. 2008. Genes IX. Jones and Bartlett. 9na ed. Miami. 892 pp
- Lothrop, H.D. y W.K. Reisen. 2001. Landscape affects the host-seeking patterns of *Culex tarsalis* (Diptera:Culicidae) in the Coachella Valley of California. *Journal of Medical Entomology* 38(2): 325-332
- McKinney, R.M.; Spillane, J.T. y Holden, P. 1972. Mosquito blood meals: identification by a fluorescent antibody method. *Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 21(6): 999-1003
- Meece, J.K.; Reynolds, C.E.; Stockwell, P.J.; Jenson, T.A.; Christensen, J.E. y K.D. Reed. 2005. Identification of mosquito bloodmeal source by terminal restriction fragment length polymorphism profile analysis of the cytochrome b gene. *Journal of Medical Entomology* 42(4): 657-667
- Monzón, M. L. 2007. 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 en Bioquímica y Microbiología, Universidad del Valle de Guatemala. Guatemala, 124 pp
- Mukabana, W.R.; Takken, W. y B.G.J. Knols. 2002. Analysis of arthropod bloodmeals using molecular genetic markers. *Trends in Parasitology* 18(11): 505-509
- ; Takken, W.; Seda, P.; Killeen, G.F.; Hawley, W.A. y B.G.J. Knols. 2002. Extent of digestion affects the success of amplifying human DNA from blood meals of *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae). *Bulletin of Entomological Research* 92: 232-239
- Nelson, R.L.; Tempelis, C.H.; Reeves, W.C. y M.M. Milby. 1976. Relation of mosquito density to bird:mammal feeding ratios of *Culex tarsalis* in stable traps. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 25(4):644-654

- Ngo, K.A. y L.D. Kramer. 2003. Identification of mosquito bloodmeals using polymerase chain reaction (PCR) with order specific primers. *Journal of Medical Entomology* 40(2):215-222
- Parson, W.; Pegoraro, K.; Niederstätter, H.; Föger, M. y M. Steinlechner. 2000. Species identification by means of the cytochrome b gene. *International Journal of Legal Medicine* 114: 23-28
- Pereira, S.L. 2000. Mitochondrial genome organization and vertebrate phylogenetics. *Genetics and Molecular Biology* 23(4): 745-752
- Reiter, P. 1983. A portable, battery-powered trap for collecting gravid *Culex* mosquitoes. *Mosquito News* 43(4): 496-498
- Richards, S.L.; Anderson, S.L. y C.T. Smart. 2009. The female mosquito's quest for blood: implications for disease cycles. University of Florida
- 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
- Savage, H.M.; Anderson, M.; Gordon, E.; McMillen, L.; Colton, L.; Delorey, M.; Sutherland, G.; Aspen, S.; Charnetzky, D.; Burkhalter, K. y M. Godsey. 2008. Host-seeking heights, host-seeking activity patterns, and West Nile Virus infection rates for members of the *Culex pipiens* complex at different habitat types within the hybrid zone, Shelby County, TN, 2002 (Diptera: Culicidae). *Journal of Medical Entomology* 45(2): 276-288
- Schmidt, K.A. y R.S. Ostfeld. 2001. Biodiversity and the dilution effect in disease ecology. *Ecology* 2(82): 609-619.
- Sirivanakarn S. A. 1982. Review of the systematics and proposed scheme of internal classification of the New World subgenus *Melanoconion* of *Culex* (Diptera: Culicidae). *Mosquito Systematics* 14:265–333
- Srihongse, S. y P. Galindo. 1967. The isolation of eastern equine encephalitis virus from *Culex* (*Melanoconion*) *taeniopus* Dyar and Knab in Panama. *Mosquito News* 27:74-76
- Sudia, W.D. y R.W. Chamberlain. 1962. Battery operated light trap, an improved model. *Mosquito News* 22: 126-129

- Tempelis, C.H. 1975. Host feeding patterns of mosquitoes with a review of advances in analysis of blood meals by serology. *Journal of Medical Entomology* 11: 635-653
- Toda, A. y R. E. Shope. 1965. Transmission of Guama and Oriboca viruses by naturally infected mosquitoes. *Nature* 208: 304
- Turell, M.; 2000. Potential for New York mosquitoes to transmit West Nile Virus. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 62(3): 413-414
- Weaver, S. C. 1986. Electron microscopic analysis of infectoin patterns for Venezuelan equine encephalomyelitis virus in the vector mosquito *Culex (Melanoconion) taeniopus*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 35(3):624-631
- White, S.L.; Ward, M.P.; Budke, C.M.; Cyr, T. y R. Bueno. 2009. A comparison of gravid and under-house CO₂-baited CDC light traps for mosquito species of public Elath importante in Houston, Texas. *Journal of Medical Entomology* 46(6):1494-1497
- Zhou, G.; Kohlhepp, P.; Geiser, D. Frasquillo, M.; Vazquez-Moreno, L. y J.J. Winzerling. 2007. Fate of blood meal iron in mosquitoes. *Journal of Insect Physiology* 53(11): 1169-11

VII. APÉNDICE

APÉNDICE I. Resultados de PCR para la identificación de ingesta sanguínea

Código	Especie	Cuadrante	Tipo de trampa	Fecha colecta	Identificación
GU-2007-00933-01	<i>Cx. taeniopus</i>	1	CDC Light Trap	1/13/07	Vertebrado
GU-2007-00959-01	<i>Cx. taeniopus</i>	7	CDC Light Trap	1/13/07	No ID
GU-2007-01092-01	<i>Cx. taeniopus</i>	1	CDC Light Trap	2/8/07	Vertebrado
GU-2007-01007-01	<i>Cx. taeniopus</i>	2	CDC Light Trap	2/8/07	No ID
GU-2007-01057-01	<i>Cx. taeniopus</i>	7	CDC Light Trap	2/9/07	No ID
GU-2007-01159-01	<i>Cx. taeniopus</i>	1	CDC Light Trap	3/23/07	No ID
GU-2007-01159-02	<i>Cx. taeniopus</i>	1	CDC Light Trap	3/23/07	No ID
GU-2007-01159-03	<i>Cx. taeniopus</i>	1	CDC Light Trap	3/23/07	Vertebrado
GU-2007-01159-04	<i>Cx. taeniopus</i>	1	CDC Light Trap	3/23/07	No ID
GU-2007-01159-05	<i>Cx. taeniopus</i>	1	CDC Light Trap	3/23/07	No ID
GU-2007-01159-06	<i>Cx. taeniopus</i>	1	CDC Light Trap	3/23/07	Vertebrado
GU-2007-01159-07	<i>Cx. taeniopus</i>	1	CDC Light Trap	3/23/07	No ID
GU-2007-01258-01	<i>Cx. taeniopus</i>	2	CDC Light Trap	3/23/07	No ID
GU-2007-01258-02	<i>Cx. taeniopus</i>	2	CDC Light Trap	3/23/07	Vertebrado
GU-2007-01258-03	<i>Cx. taeniopus</i>	2	CDC Light Trap	3/23/07	No ID
GU-2007-01258-04	<i>Cx. taeniopus</i>	2	CDC Light Trap	3/23/07	No ID
GU-2007-01258-05	<i>Cx. taeniopus</i>	2	CDC Light Trap	3/23/07	No ID
GU-2007-01258-06	<i>Cx. taeniopus</i>	2	CDC Light Trap	3/23/07	No ID
GU-2007-01970-01	<i>Cx. taeniopus</i>	2	CDC Light Trap	6/1/07	No ID
GU-2007-01985-01	<i>Cx. taeniopus</i>	1	CDC Light Trap	6/30/07	Ave
GU-2007-02463-01	<i>Cx. taeniopus</i>	1	CDC Light Trap	8/2/07	Mamífero
GU-2007-02463-02	<i>Cx. taeniopus</i>	1	CDC Light Trap	8/2/07	Vertebrado
GU-2007-02463-03	<i>Cx. taeniopus</i>	1	CDC Light Trap	8/2/07	Mamífero
GU-2007-02463-04	<i>Cx. taeniopus</i>	1	CDC Light Trap	8/2/07	Mamífero
GU-2007-02463-05	<i>Cx. taeniopus</i>	1	CDC Light Trap	8/2/07	<i>Bos taurus</i>
GU-2007-02463-06	<i>Cx. taeniopus</i>	1	CDC Light Trap	8/2/07	Mamífero
GU-2007-02463-07	<i>Cx. taeniopus</i>	1	CDC Light Trap	8/2/07	Vertebrado
GU-2007-02463-08	<i>Cx. taeniopus</i>	1	CDC Light Trap	8/2/07	Mamífero
GU-2007-02463-09	<i>Cx. taeniopus</i>	1	CDC Light Trap	8/2/07	Mamífero
GU-2007-02463-10	<i>Cx. taeniopus</i>	1	CDC Light Trap	8/2/07	Vertebrado
GU-2007-02463-11	<i>Cx. taeniopus</i>	1	CDC Light Trap	8/2/07	No ID
GU-2007-02463-12	<i>Cx. taeniopus</i>	1	CDC Light Trap	8/2/07	Vertebrado
GU-2007-02463-13	<i>Cx. taeniopus</i>	1	CDC Light Trap	8/2/07	Mamífero
GU-2007-02463-14	<i>Cx. taeniopus</i>	1	CDC Light Trap	8/2/07	Vertebrado
GU-2007-02463-15	<i>Cx. taeniopus</i>	1	CDC Light Trap	8/2/07	Vertebrado
GU-2007-02463-16	<i>Cx. taeniopus</i>	1	CDC Light Trap	8/2/07	Vertebrado
GU-2007-02463-17	<i>Cx. taeniopus</i>	1	CDC Light Trap	8/2/07	No ID
GU-2007-02463-18	<i>Cx. taeniopus</i>	1	CDC Light Trap	8/2/07	No ID
GU-2007-02463-19	<i>Cx. taeniopus</i>	1	CDC Light Trap	8/2/07	Vertebrado
GU-2007-02463-20	<i>Cx. taeniopus</i>	1	CDC Light Trap	8/2/07	Vertebrado

Código	Especie	Cuadrante	Tipo de trampa	Fecha colecta	Identificación
GU-2007-02463-21	<i>Cx. taeniopus</i>	1	CDC Light Trap	8/2/07	<i>Gallus gallus</i>
GU-2007-02266-01	<i>Cx. taeniopus</i>	2	CDC Light Trap	8/2/07	Ave
GU-2007-02266-02	<i>Cx. taeniopus</i>	2	CDC Light Trap	8/2/07	No ID
GU-2007-02266-03	<i>Cx. taeniopus</i>	2	CDC Light Trap	8/2/07	Ave
GU-2007-02266-04	<i>Cx. taeniopus</i>	2	CDC Light Trap	8/2/07	Vertebrado
GU-2007-02578-01	<i>Cx. taeniopus</i>	7	Blitz-CDC	8/2/07	<i>Bos taurus</i>
GU-2007-02578-02	<i>Cx. taeniopus</i>	7	Blitz-CDC	8/2/07	Vertebrado
GU-2007-02578-03	<i>Cx. taeniopus</i>	7	Blitz-CDC	8/2/07	Vertebrado
GU-2007-02578-04	<i>Cx. taeniopus</i>	7	Blitz-CDC	8/2/07	<i>Bos taurus</i>
GU-2007-02578-05	<i>Cx. taeniopus</i>	7	Blitz-CDC	8/2/07	<i>Canis familiaris</i>
GU-2007-02606-01	<i>Cx. taeniopus</i>	10	Blitz-CDC	8/3/07	Vertebrado
GU-2007-02704-01	<i>Cx. taeniopus</i>	7	Blitz-CDC	8/11/07	Vertebrado
GU-2007-08284-01	<i>Cx. taeniopus</i>	1	CDC Light Trap	8/30/07	<i>Bos taurus</i>
GU-2007-08284-02	<i>Cx. taeniopus</i>	1	CDC Light Trap	8/30/07	<i>Bos taurus</i>
GU-2007-08284-03	<i>Cx. taeniopus</i>	1	CDC Light Trap	8/30/07	<i>Bos taurus</i>
GU-2007-08284-04	<i>Cx. taeniopus</i>	1	CDC Light Trap	8/30/07	Vertebrado
GU-2007-08284-05	<i>Cx. taeniopus</i>	1	CDC Light Trap	8/30/07	Vertebrado
GU-2007-08284-06	<i>Cx. taeniopus</i>	1	CDC Light Trap	8/30/07	<i>Bos taurus</i>
GU-2007-08284-07	<i>Cx. taeniopus</i>	1	CDC Light Trap	8/30/07	Vertebrado
GU-2007-08284-08	<i>Cx. taeniopus</i>	1	CDC Light Trap	8/30/07	No ID
GU-2007-08284-09	<i>Cx. taeniopus</i>	1	CDC Light Trap	8/30/07	Vertebrado
GU-2007-08284-10	<i>Cx. taeniopus</i>	1	CDC Light Trap	8/30/07	No ID
GU-2007-08284-11	<i>Cx. taeniopus</i>	1	CDC Light Trap	8/30/07	No ID
GU-2007-08095-01	<i>Cx. taeniopus</i>	2	CDC Light Trap	8/30/07	Vertebrado
GU-2007-08095-02	<i>Cx. taeniopus</i>	2	CDC Light Trap	8/30/07	Vertebrado
GU-2007-08095-03	<i>Cx. taeniopus</i>	2	CDC Light Trap	8/30/07	Ave
GU-2007-08095-04	<i>Cx. taeniopus</i>	2	CDC Light Trap	8/30/07	Vertebrado
GU-2007-08095-05	<i>Cx. taeniopus</i>	2	CDC Light Trap	8/30/07	Mamífero
GU-2007-08095-06	<i>Cx. taeniopus</i>	2	CDC Light Trap	8/30/07	Mamífero
GU-2007-08095-07	<i>Cx. taeniopus</i>	2	CDC Light Trap	8/30/07	Vertebrado
GU-2007-08095-08	<i>Cx. taeniopus</i>	2	CDC Light Trap	8/30/07	Vertebrado
GU-2007-08095-09	<i>Cx. taeniopus</i>	2	CDC Light Trap	8/30/07	Vertebrado
GU-2007-08095-10	<i>Cx. taeniopus</i>	2	CDC Light Trap	8/30/07	Ave
GU-2007-08095-11	<i>Cx. taeniopus</i>	2	CDC Light Trap	8/30/07	Vertebrado
GU-2007-08095-12	<i>Cx. taeniopus</i>	2	CDC Light Trap	8/30/07	<i>Canis familiaris</i>
GU-2007-08117-01	<i>Cx. taeniopus</i>	2	Gravid Trap	8/30/07	<i>Homo sapiens</i>
GU-2007-08257-01	<i>Cx. taeniopus</i>	7	CDC Light Trap	8/30/07	Vertebrado
GU-2007-08257-02	<i>Cx. taeniopus</i>	7	CDC Light Trap	8/30/07	No ID
GU-2007-08530-01	<i>Cx. taeniopus</i>	7	Blitz-CDC	8/30/07	Vertebrado
GU-2007-08530-02	<i>Cx. taeniopus</i>	7	Blitz-CDC	8/30/07	Vertebrado
GU-2007-08567-01	<i>Cx. taeniopus</i>	8	Blitz-CDC	8/30/07	<i>Bos taurus</i>
GU-2007-09883-01	<i>Cx. taeniopus</i>	1	CDC Light Trap	9/20/07	No ID
GU-2007-09883-02	<i>Cx. taeniopus</i>	1	CDC Light Trap	9/20/07	No ID
GU-2007-09883-03	<i>Cx. taeniopus</i>	1	CDC Light Trap	9/20/07	Vertebrado
GU-2007-09883-04	<i>Cx. taeniopus</i>	1	CDC Light Trap	9/20/07	No ID
GU-2007-09883-05	<i>Cx. taeniopus</i>	1	CDC Light Trap	9/20/07	Vertebrado
GU-2007-09883-06	<i>Cx. taeniopus</i>	1	CDC Light Trap	9/20/07	No ID

Código	Especie	Cuadrante	Tipo de trampa	Fecha colecta	Identificación
GU-2007-09883-07	<i>Cx. taeniorhynchus</i>	1	CDC Light Trap	9/20/07	No ID
GU-2007-09883-08	<i>Cx. taeniorhynchus</i>	1	CDC Light Trap	9/20/07	Mamífero
GU-2007-09883-09	<i>Cx. taeniorhynchus</i>	1	CDC Light Trap	9/20/07	Vertebrado
GU-2007-10245-01	<i>Cx. taeniorhynchus</i>	1	Blitz-CDC	9/21/07	Vertebrado
GU-2007-10245-02	<i>Cx. taeniorhynchus</i>	1	Blitz-CDC	9/21/07	Mamífero
GU-2007-10245-03	<i>Cx. taeniorhynchus</i>	1	Blitz-CDC	9/21/07	Vertebrado
GU-2007-10245-04	<i>Cx. taeniorhynchus</i>	1	Blitz-CDC	9/21/07	Mamífero
GU-2007-10245-05	<i>Cx. taeniorhynchus</i>	1	Blitz-CDC	9/21/07	Vertebrado
GU-2007-10245-06	<i>Cx. taeniorhynchus</i>	1	Blitz-CDC	9/21/07	Vertebrado
GU-2007-10245-07	<i>Cx. taeniorhynchus</i>	1	Blitz-CDC	9/21/07	Mamífero
GU-2007-10245-08	<i>Cx. taeniorhynchus</i>	1	Blitz-CDC	9/21/07	Mamífero
GU-2007-10226-01	<i>Cx. taeniorhynchus</i>	2	Blitz-CDC	9/21/07	<i>Bos taurus</i>
GU-2007-10115-01	<i>Cx. taeniorhynchus</i>	8	Blitz-CDC	9/21/07	Vertebrado
GU-2007-10115-02	<i>Cx. taeniorhynchus</i>	8	Blitz-CDC	9/21/07	No ID
GU-2007-10548-01	<i>Cx. taeniorhynchus</i>	5	Blitz Gravida	9/25/07	<i>Canis familiaris</i>
GU-2007-11300-01	<i>Cx. taeniorhynchus</i>	8	Blitz-CDC	9/28/07	No ID
GU-2007-11318-01	<i>Cx. taeniorhynchus</i>	8	Blitz-CDC	9/28/07	No ID
GU-2007-11470-01	<i>Cx. taeniorhynchus</i>	1	CDC Light Trap	11/9/07	<i>Bos taurus</i>
GU-2007-11412-01	<i>Cx. taeniorhynchus</i>	2	CDC Light Trap	11/9/07	<i>Canis familiaris</i>
GU-2007-11412-02	<i>Cx. taeniorhynchus</i>	2	CDC Light Trap	11/9/07	<i>Bos taurus</i>
GU-2007-11412-03	<i>Cx. taeniorhynchus</i>	2	CDC Light Trap	11/9/07	No ID
GU-2007-11412-04	<i>Cx. taeniorhynchus</i>	2	CDC Light Trap	11/9/07	<i>Canis familiaris</i>
GU-2007-11412-05	<i>Cx. taeniorhynchus</i>	2	CDC Light Trap	11/9/07	Ave
GU-2007-11412-06	<i>Cx. taeniorhynchus</i>	2	CDC Light Trap	11/9/07	<i>Canis familiaris</i>
GU-2007-11412-07	<i>Cx. taeniorhynchus</i>	2	CDC Light Trap	11/9/07	<i>Gallus gallus</i>
GU-2007-11412-08	<i>Cx. taeniorhynchus</i>	2	CDC Light Trap	11/9/07	<i>Gallus gallus</i>
GU-2007-11412-09	<i>Cx. taeniorhynchus</i>	2	CDC Light Trap	11/9/07	<i>Gallus gallus</i>
GU-2007-11412-10	<i>Cx. taeniorhynchus</i>	2	CDC Light Trap	11/9/07	Vertebrado
GU-2007-11412-11	<i>Cx. taeniorhynchus</i>	2	CDC Light Trap	11/9/07	<i>Canis familiaris</i>
GU-2007-11412-12	<i>Cx. taeniorhynchus</i>	2	CDC Light Trap	11/9/07	<i>Gallus gallus</i>
GU-2007-11412-13	<i>Cx. taeniorhynchus</i>	2	CDC Light Trap	11/9/07	<i>Gallus gallus</i>
GU-2007-11412-14	<i>Cx. taeniorhynchus</i>	2	CDC Light Trap	11/9/07	Vertebrado
GU-2007-11412-15	<i>Cx. taeniorhynchus</i>	2	CDC Light Trap	11/9/07	<i>Gallus gallus</i>
GU-2007-11412-16	<i>Cx. taeniorhynchus</i>	2	CDC Light Trap	11/9/07	<i>Gallus gallus</i>
GU-2007-11412-17	<i>Cx. taeniorhynchus</i>	2	CDC Light Trap	11/9/07	<i>Gallus gallus</i>
GU-2007-11412-18	<i>Cx. taeniorhynchus</i>	2	CDC Light Trap	11/9/07	<i>Canis familiaris</i>
GU-2007-11412-19	<i>Cx. taeniorhynchus</i>	2	CDC Light Trap	11/9/07	<i>Gallus gallus</i>
GU-2007-11412-20	<i>Cx. taeniorhynchus</i>	2	CDC Light Trap	11/9/07	Vertebrado
GU-2007-11412-21	<i>Cx. taeniorhynchus</i>	2	CDC Light Trap	11/9/07	<i>Gallus gallus</i>
GU-2007-11412-22	<i>Cx. taeniorhynchus</i>	2	CDC Light Trap	11/9/07	<i>Canis familiaris</i>
GU-2007-11412-23	<i>Cx. taeniorhynchus</i>	2	CDC Light Trap	11/9/07	<i>Canis familiaris</i>
GU-2007-11412-24	<i>Cx. taeniorhynchus</i>	2	CDC Light Trap	11/9/07	<i>Gallus gallus</i>
GU-2007-11412-25	<i>Cx. taeniorhynchus</i>	2	CDC Light Trap	11/9/07	No ID
GU-2007-11412-26	<i>Cx. taeniorhynchus</i>	2	CDC Light Trap	11/9/07	<i>Gallus gallus</i>
GU-2007-11412-27	<i>Cx. taeniorhynchus</i>	2	CDC Light Trap	11/9/07	<i>Gallus gallus</i>
GU-2007-11412-28	<i>Cx. taeniorhynchus</i>	2	CDC Light Trap	11/9/07	<i>Gallus gallus</i>
GU-2007-11412-29	<i>Cx. taeniorhynchus</i>	2	CDC Light Trap	11/9/07	<i>Gallus gallus</i>

Código	Especie	Cuadrante	Tipo de trampa	Fecha colecta	Identificación
GU-2007-11412-30	<i>Cx. taeniopus</i>	2	CDC Light Trap	11/9/07	Vertebrado
GU-2007-11412-31	<i>Cx. taeniopus</i>	2	CDC Light Trap	11/9/07	<i>Gallus gallus</i>
GU-2007-11412-32	<i>Cx. taeniopus</i>	2	CDC Light Trap	11/9/07	<i>Gallus gallus</i>
GU-2007-11412-33	<i>Cx. taeniopus</i>	2	CDC Light Trap	11/9/07	<i>Canis familiaris</i>
GU-2007-11412-34	<i>Cx. taeniopus</i>	2	CDC Light Trap	11/9/07	<i>Canis familiaris</i>
GU-2007-11412-35	<i>Cx. taeniopus</i>	2	CDC Light Trap	11/9/07	<i>Gallus gallus</i>
GU-2007-11412-36	<i>Cx. taeniopus</i>	2	CDC Light Trap	11/9/07	Vertebrado
GU-2007-11412-37	<i>Cx. taeniopus</i>	2	CDC Light Trap	11/9/07	Ave
GU-2007-11412-38	<i>Cx. taeniopus</i>	2	CDC Light Trap	11/9/07	<i>Gallus gallus</i>
GU-2007-11412-39	<i>Cx. taeniopus</i>	2	CDC Light Trap	11/9/07	<i>Gallus gallus</i>
GU-2007-11412-40	<i>Cx. taeniopus</i>	2	CDC Light Trap	11/9/07	<i>Gallus gallus</i>
GU-2007-11412-41	<i>Cx. taeniopus</i>	2	CDC Light Trap	11/9/07	Vertebrado
GU-2007-11412-42	<i>Cx. taeniopus</i>	2	CDC Light Trap	11/9/07	No ID
GU-2007-11412-43	<i>Cx. taeniopus</i>	2	CDC Light Trap	11/9/07	<i>Gallus gallus</i>
GU-2007-11412-44	<i>Cx. taeniopus</i>	2	CDC Light Trap	11/9/07	Vertebrado
GU-2007-11412-45	<i>Cx. taeniopus</i>	2	CDC Light Trap	11/9/07	<i>Gallus gallus</i>
GU-2007-11412-46	<i>Cx. taeniopus</i>	2	CDC Light Trap	11/9/07	Vertebrado
GU-2007-11412-47	<i>Cx. taeniopus</i>	2	CDC Light Trap	11/9/07	<i>Gallus gallus</i>
GU-2007-11412-48	<i>Cx. taeniopus</i>	2	CDC Light Trap	11/9/07	Vertebrado
GU-2007-11412-49	<i>Cx. taeniopus</i>	2	CDC Light Trap	11/9/07	<i>Gallus gallus</i>
GU-2007-11412-50	<i>Cx. taeniopus</i>	2	CDC Light Trap	11/9/07	Vertebrado
GU-2007-11426-01	<i>Cx. taeniopus</i>	2	CDC Light Trap	11/9/07	<i>Gallus gallus</i>
GU-2007-11426-02	<i>Cx. taeniopus</i>	2	CDC Light Trap	11/9/07	<i>Canis familiaris</i>
GU-2007-11426-03	<i>Cx. taeniopus</i>	2	CDC Light Trap	11/9/07	<i>Canis familiaris</i>
GU-2007-11426-04	<i>Cx. taeniopus</i>	2	CDC Light Trap	11/9/07	<i>Canis familiaris</i>
GU-2007-11426-05	<i>Cx. taeniopus</i>	2	CDC Light Trap	11/9/07	<i>Canis familiaris</i>
GU-2007-11426-06	<i>Cx. taeniopus</i>	2	CDC Light Trap	11/9/07	<i>Gallus gallus</i>
GU-2007-11426-07	<i>Cx. taeniopus</i>	2	CDC Light Trap	11/9/07	<i>Canis familiaris</i>
GU-2007-11426-08	<i>Cx. taeniopus</i>	2	CDC Light Trap	11/9/07	<i>Canis familiaris</i>
GU-2007-11426-09	<i>Cx. taeniopus</i>	2	CDC Light Trap	11/9/07	Vertebrado
GU-2007-11426-10	<i>Cx. taeniopus</i>	2	CDC Light Trap	11/9/07	<i>Gallus gallus</i>
GU-2007-11426-11	<i>Cx. taeniopus</i>	2	CDC Light Trap	11/9/07	No ID
GU-2007-11633-01	<i>Cx. taeniopus</i>	1	CDC Light Trap	11/30/07	Mamífero
GU-2007-11633-02	<i>Cx. taeniopus</i>	1	CDC Light Trap	11/30/07	No ID
GU-2007-11610-01	<i>Cx. taeniopus</i>	2	CDC Light Trap	11/30/07	<i>Gallus gallus</i>
GU-2007-11610-02	<i>Cx. taeniopus</i>	2	CDC Light Trap	11/30/07	Ave
GU-2007-11610-03	<i>Cx. taeniopus</i>	2	CDC Light Trap	11/30/07	<i>Gallus gallus</i>
GU-2007-11610-04	<i>Cx. taeniopus</i>	2	CDC Light Trap	11/30/07	<i>Gallus gallus</i>
GU-2007-11610-05	<i>Cx. taeniopus</i>	2	CDC Light Trap	11/30/07	<i>Gallus gallus</i>
GU-2007-11610-06	<i>Cx. taeniopus</i>	2	CDC Light Trap	11/30/07	<i>Gallus gallus</i>
GU-2007-11610-07	<i>Cx. taeniopus</i>	2	CDC Light Trap	11/30/07	<i>Gallus gallus</i>
GU-2007-11610-08	<i>Cx. taeniopus</i>	2	CDC Light Trap	11/30/07	<i>Gallus gallus</i>
GU-2007-11610-09	<i>Cx. taeniopus</i>	2	CDC Light Trap	11/30/07	<i>Gallus gallus</i>
GU-2007-11610-10	<i>Cx. taeniopus</i>	2	CDC Light Trap	11/30/07	<i>Gallus gallus</i>
GU-2007-11610-11	<i>Cx. taeniopus</i>	2	CDC Light Trap	11/30/07	<i>Gallus gallus</i>
GU-2007-11610-12	<i>Cx. taeniopus</i>	2	CDC Light Trap	11/30/07	<i>Gallus gallus</i>
GU-2007-11610-13	<i>Cx. taeniopus</i>	2	CDC Light Trap	11/30/07	<i>Gallus gallus</i>

Código	Especie	Cuadrante	Tipo de trampa	Fecha colecta	Identificación
GU-2007-11610-14	<i>Cx. taeniopus</i>	2	CDC Light Trap	11/30/07	<i>Gallus gallus</i>
GU-2007-11610-15	<i>Cx. taeniopus</i>	2	CDC Light Trap	11/30/07	<i>Gallus gallus</i>
GU-2007-11679-01	<i>Cx. taeniopus</i>	7	CDC Light Trap	11/30/07	<i>Canis familiaris</i>
GU-2007-11703-01	<i>Cx. taeniopus</i>	1	Blitz-CDC	12/1/07	Vertebrado
GU-2007-11703-02	<i>Cx. taeniopus</i>	1	Blitz-CDC	12/1/07	Vertebrado
GU-2007-11703-03	<i>Cx. taeniopus</i>	1	Blitz-CDC	12/1/07	Vertebrado
GU-2007-11703-04	<i>Cx. taeniopus</i>	1	Blitz-CDC	12/1/07	<i>Bos taurus</i>
GU-2007-11703-05	<i>Cx. taeniopus</i>	1	Blitz-CDC	12/1/07	Vertebrado
GU-2007-11703-06	<i>Cx. taeniopus</i>	1	Blitz-CDC	12/1/07	Mamífero
GU-2007-11703-07	<i>Cx. taeniopus</i>	1	Blitz-CDC	12/1/07	Mamífero
GU-2007-11703-08	<i>Cx. taeniopus</i>	1	Blitz-CDC	12/1/07	Vertebrado
GU-2007-11703-09	<i>Cx. taeniopus</i>	1	Blitz-CDC	12/1/07	Vertebrado
GU-2007-11703-10	<i>Cx. taeniopus</i>	1	Blitz-CDC	12/1/07	No ID
GU-2007-11703-11	<i>Cx. taeniopus</i>	1	Blitz-CDC	12/1/07	Ave
GU-2007-11703-12	<i>Cx. taeniopus</i>	1	Blitz-CDC	12/1/07	Vertebrado
GU-2007-11703-13	<i>Cx. taeniopus</i>	1	Blitz-CDC	12/1/07	Vertebrado
GU-2007-11703-14	<i>Cx. taeniopus</i>	1	Blitz-CDC	12/1/07	Mamífero
GU-2007-11703-15	<i>Cx. taeniopus</i>	1	Blitz-CDC	12/1/07	<i>Bos taurus</i>
GU-2007-11703-16	<i>Cx. taeniopus</i>	1	Blitz-CDC	12/1/07	Mamífero
GU-2007-11703-17	<i>Cx. taeniopus</i>	1	Blitz-CDC	12/1/07	Mamífero
GU-2007-11703-18	<i>Cx. taeniopus</i>	1	Blitz-CDC	12/1/07	Vertebrado
GU-2007-11703-19	<i>Cx. taeniopus</i>	1	Blitz-CDC	12/1/07	Mamífero
GU-2007-11703-20	<i>Cx. taeniopus</i>	1	Blitz-CDC	12/1/07	Vertebrado
GU-2007-11703-21	<i>Cx. taeniopus</i>	1	Blitz-CDC	12/1/07	Mamífero
GU-2007-11703-22	<i>Cx. taeniopus</i>	1	Blitz-CDC	12/1/07	Mamífero
GU-2007-11703-23	<i>Cx. taeniopus</i>	1	Blitz-CDC	12/1/07	Vertebrado
GU-2007-11703-24	<i>Cx. taeniopus</i>	1	Blitz-CDC	12/1/07	Vertebrado
GU-2007-11703-25	<i>Cx. taeniopus</i>	1	Blitz-CDC	12/1/07	Vertebrado
GU-2007-11703-26	<i>Cx. taeniopus</i>	1	Blitz-CDC	12/1/07	Mamífero
GU-2007-11703-27	<i>Cx. taeniopus</i>	1	Blitz-CDC	12/1/07	Vertebrado
GU-2007-11831-01	<i>Cx. taeniopus</i>	6	Blitz-CDC	12/7/07	<i>Canis familiaris</i>
GU-2008-00059-01	<i>Cx. taeniopus</i>	1	Gravid Trap	1/31/08	<i>Gallus gallus</i>
GU-2008-00059-02	<i>Cx. taeniopus</i>	1	Gravid Trap	1/31/08	<i>Gallus gallus</i>
GU-2008-00065-01	<i>Cx. taeniopus</i>	2	Gravid Trap	1/31/08	Mamífero
GU-2008-00175-01	<i>Cx. taeniopus</i>	1	CDC Light Trap	2/20/08	No ID
GU-2008-00175-02	<i>Cx. taeniopus</i>	1	CDC Light Trap	2/20/08	Vertebrado
GU-2008-00101-01	<i>Cx. taeniopus</i>	2	CDC Light Trap	2/20/08	Vertebrado
GU-2008-00101-02	<i>Cx. taeniopus</i>	2	CDC Light Trap	2/20/08	<i>Canis familiaris</i>
GU-2008-00101-03	<i>Cx. taeniopus</i>	2	CDC Light Trap	2/20/08	<i>Canis familiaris</i>
GU-2008-00101-04	<i>Cx. taeniopus</i>	2	CDC Light Trap	2/20/08	<i>Gallus gallus</i>
GU-2008-00101-05	<i>Cx. taeniopus</i>	2	CDC Light Trap	2/20/08	<i>Gallus gallus</i>
GU-2008-00101-06	<i>Cx. taeniopus</i>	2	CDC Light Trap	2/20/08	<i>Gallus gallus</i>
GU-2008-00101-07	<i>Cx. taeniopus</i>	2	CDC Light Trap	2/20/08	<i>Gallus gallus</i>
GU-2008-00101-08	<i>Cx. taeniopus</i>	2	CDC Light Trap	2/20/08	Vertebrado
GU-2008-00101-09	<i>Cx. taeniopus</i>	2	CDC Light Trap	2/20/08	<i>Gallus gallus</i>
GU-2008-00101-10	<i>Cx. taeniopus</i>	2	CDC Light Trap	2/20/08	<i>Gallus gallus</i>
GU-2008-00101-11	<i>Cx. taeniopus</i>	2	CDC Light Trap	2/20/08	No ID

Código	Especie	Cuadrante	Tipo de trampa	Fecha colecta	Identificación
GU-2008-00101-12	<i>Cx. taeniopus</i>	2	CDC Light Trap	2/20/08	<i>Gallus gallus</i>
GU-2008-00141-01	<i>Cx. taeniopus</i>	2	Blitz-CDC	2/20/08	<i>Gallus gallus</i>
GU-2008-00141-02	<i>Cx. taeniopus</i>	2	Blitz-CDC	2/20/08	Vertebrado
GU-2008-00141-03	<i>Cx. taeniopus</i>	2	Blitz-CDC	2/20/08	Vertebrado
GU-2008-00141-04	<i>Cx. taeniopus</i>	2	Blitz-CDC	2/20/08	Vertebrado
GU-2008-00141-05	<i>Cx. taeniopus</i>	2	Blitz-CDC	2/20/08	Vertebrado
GU-2008-00141-06	<i>Cx. taeniopus</i>	2	Blitz-CDC	2/20/08	Vertebrado
GU-2008-00141-07	<i>Cx. taeniopus</i>	2	Blitz-CDC	2/20/08	Vertebrado
GU-2008-00141-08	<i>Cx. taeniopus</i>	2	Blitz-CDC	2/20/08	<i>Gallus gallus</i>
GU-2008-00141-09	<i>Cx. taeniopus</i>	2	Blitz-CDC	2/20/08	<i>Gallus gallus</i>
GU-2008-00141-10	<i>Cx. taeniopus</i>	2	Blitz-CDC	2/20/08	<i>Gallus gallus</i>
GU-2008-00141-11	<i>Cx. taeniopus</i>	2	Blitz-CDC	2/20/08	Vertebrado
GU-2008-00141-12	<i>Cx. taeniopus</i>	2	Blitz-CDC	2/20/08	Vertebrado
GU-2008-00141-13	<i>Cx. taeniopus</i>	2	Blitz-CDC	2/20/08	<i>Gallus gallus</i>
GU-2008-00141-14	<i>Cx. taeniopus</i>	2	Blitz-CDC	2/20/08	Vertebrado
GU-2008-00141-15	<i>Cx. taeniopus</i>	2	Blitz-CDC	2/20/08	<i>Gallus gallus</i>
GU-2008-00141-16	<i>Cx. taeniopus</i>	2	Blitz-CDC	2/20/08	Vertebrado
GU-2008-00141-17	<i>Cx. taeniopus</i>	2	Blitz-CDC	2/20/08	<i>Gallus gallus</i>
GU-2008-00141-18	<i>Cx. taeniopus</i>	2	Blitz-CDC	2/20/08	<i>Gallus gallus</i>
GU-2008-00141-19	<i>Cx. taeniopus</i>	2	Blitz-CDC	2/20/08	<i>Gallus gallus</i>
GU-2008-00141-20	<i>Cx. taeniopus</i>	2	Blitz-CDC	2/20/08	Vertebrado
GU-2008-00141-21	<i>Cx. taeniopus</i>	2	Blitz-CDC	2/20/08	<i>Gallus gallus</i>
GU-2008-00141-22	<i>Cx. taeniopus</i>	2	Blitz-CDC	2/20/08	<i>Gallus gallus</i>
GU-2008-00141-23	<i>Cx. taeniopus</i>	2	Blitz-CDC	2/20/08	No ID
GU-2008-00306-01	<i>Cx. taeniopus</i>	2	CDC Light Trap	3/13/08	Vertebrado
GU-2008-00306-02	<i>Cx. taeniopus</i>	2	CDC Light Trap	3/13/08	<i>Canis familiaris</i>
GU-2008-00306-03	<i>Cx. taeniopus</i>	2	CDC Light Trap	3/13/08	<i>Gallus gallus</i>
GU-2008-00306-04	<i>Cx. taeniopus</i>	2	CDC Light Trap	3/13/08	<i>Gallus gallus</i>
GU-2008-00306-05	<i>Cx. taeniopus</i>	2	CDC Light Trap	3/13/08	<i>Gallus gallus</i>
GU-2008-00306-06	<i>Cx. taeniopus</i>	2	CDC Light Trap	3/13/08	Vertebrado
GU-2008-00306-07	<i>Cx. taeniopus</i>	2	CDC Light Trap	3/13/08	<i>Gallus gallus</i>
GU-2008-00306-08	<i>Cx. taeniopus</i>	2	CDC Light Trap	3/13/08	<i>Gallus gallus</i>
GU-2008-00306-09	<i>Cx. taeniopus</i>	2	CDC Light Trap	3/13/08	<i>Gallus gallus</i>
GU-2008-00685-01	<i>Cx. taeniopus</i>	2	CDC Light Trap	4/14/08	Vertebrado
GU-2008-01386-01	<i>Cx. taeniopus</i>	1	CDC Light Trap	6/6/08	<i>Bos taurus</i>
GU-2008-01386-02	<i>Cx. taeniopus</i>	1	CDC Light Trap	6/6/08	No ID
GU-2008-01386-03	<i>Cx. taeniopus</i>	1	CDC Light Trap	6/6/08	No ID
GU-2008-01386-04	<i>Cx. taeniopus</i>	1	CDC Light Trap	6/6/08	<i>Bos taurus</i>
GU-2008-01386-05	<i>Cx. taeniopus</i>	1	CDC Light Trap	6/6/08	Vertebrado
GU-2008-01386-06	<i>Cx. taeniopus</i>	1	CDC Light Trap	6/6/08	<i>Bos taurus</i>
GU-2008-01386-07	<i>Cx. taeniopus</i>	1	CDC Light Trap	6/6/08	Vertebrado
GU-2008-01386-08	<i>Cx. taeniopus</i>	1	CDC Light Trap	6/6/08	No ID
GU-2008-01386-09	<i>Cx. taeniopus</i>	1	CDC Light Trap	6/6/08	Vertebrado
GU-2008-01327-01	<i>Cx. taeniopus</i>	2	CDC Light Trap	6/6/08	Vertebrado
GU-2008-01586-01	<i>Cx. taeniopus</i>	1	Gravid Trap	7/17/08	Vertebrado
GU-2008-01602-01	<i>Cx. taeniopus</i>	1	CDC Light Trap	7/17/08	Mamífero
GU-2008-01602-02	<i>Cx. taeniopus</i>	1	CDC Light Trap	7/17/08	<i>Bos taurus</i>

Código	Especie	Cuadrante	Tipo de trampa	Fecha colecta	Identificación
GU-2008-01602-03	<i>Cx. taeniorpus</i>	1	CDC Light Trap	7/17/08	Mamífero
GU-2008-01602-04	<i>Cx. taeniorpus</i>	1	CDC Light Trap	7/17/08	Gallus gallus
GU-2008-01602-05	<i>Cx. taeniorpus</i>	1	CDC Light Trap	7/17/08	Vertebrado
GU-2008-01602-06	<i>Cx. taeniorpus</i>	1	CDC Light Trap	7/17/08	Vertebrado
GU-2008-01602-07	<i>Cx. taeniorpus</i>	1	CDC Light Trap	7/17/08	Vertebrado
GU-2008-01602-08	<i>Cx. taeniorpus</i>	1	CDC Light Trap	7/17/08	Vertebrado
GU-2008-01602-09	<i>Cx. taeniorpus</i>	1	CDC Light Trap	7/17/08	No ID
GU-2008-01602-10	<i>Cx. taeniorpus</i>	1	CDC Light Trap	7/17/08	Vertebrado
GU-2008-01602-11	<i>Cx. taeniorpus</i>	1	CDC Light Trap	7/17/08	No ID
GU-2008-01602-12	<i>Cx. taeniorpus</i>	1	CDC Light Trap	7/17/08	<i>Bos taurus</i>
GU-2008-01602-13	<i>Cx. taeniorpus</i>	1	CDC Light Trap	7/17/08	Vertebrado
GU-2008-01602-14	<i>Cx. taeniorpus</i>	1	CDC Light Trap	7/17/08	<i>Gallus gallus</i>
GU-2008-01748-01	<i>Cx. taeniorpus</i>	2	Gravid Trap	7/17/08	<i>Bos taurus</i>
GU-2008-13776-01	<i>Cx. taeniorpus</i>	2	CDC Light Trap	8/21/08	Ave
GU-2008-13776-02	<i>Cx. taeniorpus</i>	2	CDC Light Trap	8/21/08	<i>Bos taurus</i>
GU-2008-13776-03	<i>Cx. taeniorpus</i>	2	CDC Light Trap	8/21/08	Vertebrado
GU-2008-13776-04	<i>Cx. taeniorpus</i>	2	CDC Light Trap	8/21/08	Vertebrado
GU-2008-13972-01	<i>Cx. taeniorpus</i>	1	CDC Light Trap	9/20/08	<i>Bos taurus</i>
GU-2008-13972-02	<i>Cx. taeniorpus</i>	1	CDC Light Trap	9/20/08	Vertebrado
GU-2008-13972-03	<i>Cx. taeniorpus</i>	1	CDC Light Trap	9/20/08	No ID
GU-2008-13972-04	<i>Cx. taeniorpus</i>	1	CDC Light Trap	9/20/08	Vertebrado
GU-2008-14087-01	<i>Cx. taeniorpus</i>	1	CDC Light Trap	10/15/08	Vertebrado
GU-2008-14087-02	<i>Cx. taeniorpus</i>	1	CDC Light Trap	10/15/08	Vertebrado
GU-2008-14087-03	<i>Cx. taeniorpus</i>	1	CDC Light Trap	10/15/08	No ID
GU-2008-14087-04	<i>Cx. taeniorpus</i>	1	CDC Light Trap	10/15/08	Vertebrado
GU-2008-14035-01	<i>Cx. taeniorpus</i>	7	CDC Light Trap	10/15/08	Ave
GU-2008-14146-01	<i>Cx. taeniorpus</i>	2	Blitz-CDC	10/31/08	Vertebrado
GU-2008-14146-02	<i>Cx. taeniorpus</i>	2	Blitz-CDC	10/31/08	Vertebrado
GU-2008-14146-03	<i>Cx. taeniorpus</i>	2	Blitz-CDC	10/31/08	Mamífero
GU-2008-14146-04	<i>Cx. taeniorpus</i>	2	Blitz-CDC	10/31/08	Vertebrado
GU-2008-14146-05	<i>Cx. taeniorpus</i>	2	Blitz-CDC	10/31/08	Vertebrado
GU-2008-15781-01	<i>Cx. taeniorpus</i>	1	Gravid Trap	12/10/08	Vertebrado

APÉNDICE II. Resultados estadísticos (Prism 5.0)

Constant	Value
Experiment Date	Apr 30, 2010
Experiment ID	Cx. taeniopus INGESTA
Notebook ID	
Project	TESIS
Experimenter	ANA L. RAMÍREZ
Protocol	

Comparación: Tipo de trampa

Contingency				
1	Table Analyzed	Trampa		
2				
3	Fisher's exact test			
4				
5	P value	0.6853		
6	P value summary	ns		
7	One- or two-sided	Two-sided		
8	Statistically significant? (alpha<0.05)	No		
9				
10	Data analyzed	Blitz	Normal	Total
11	CDC	79	220	299
12	Gravida	1	7	8
13	Total	80	227	307

Comparación: Hospederos por año 2007-2008

Contingency		
1	Table Analyzed	2007 vs 2008 d
2		
3	Chi-square	
4	Chi-square, df	7.000, 2
5	P value	0.0302
6	P value summary	*
7	One- or two-sided	NA
8	Statistically significant? (alpha<0.05)	Yes
9		
10	Data analyzed	
11	Number of rows	2
12	Number of columns	3

Comparación: Cuatrimestre

Contingency		
1	Table Analyzed	CUATRIMESTRI
2		
3	Chi-square	
4	Chi-square, df	52.24, 10
5	P value	< 0.0001
6	P value summary	***
7	One- or two-sided	NA
8	Statistically significant? (alpha<0.05)	Yes
9		
10	Data analyzed	
11	Number of rows	6
12	Number of columns	3

Comparación: Estacionalidad

Contingency		
1	Table Analyzed	Estacion
2		
3	Chi-square	
4	Chi-square, df	24.66, 6
5	P value	0.0004
6	P value summary	***
7	One- or two-sided	NA
8	Statistically significant? (alpha<0.05)	Yes
9		
10	Data analyzed	
11	Number of rows	4
12	Number of columns	3


Comparación: Cuadrante 1 y cuadrante 2 (rurales)

Contingency		
1	Table Analyzed	Contingencia cuadrante rural
2		
3	Fisher's exact test	
4		
5	P value	< 0.0001
6	P value summary	***
7	One- or two-sided	Two-sided
8	Statistically significant? (alpha<0.05)	Yes
9		
10	Data analyzed	AVE
11	Cuadrante 1	7
12	Cuadrante 2	74
13	Total	81

Correlación: Densidad zancudos vs índice de variabilidad

Correlation		A
		Data Set-A
1	Number of XY Pairs	16
2	Spearman r	0.5273
3	95% confidence interval	0.02662 to 0.8165
4	P value (two-tailed)	0.0358
5	P value summary	*
6	Exact or approximate P value?	Gaussian Approximation
7	Is the correlation significant? (alpha=0.05)	Yes

APÉNDICE III. Procedimiento de operaciones estándar para la identificación de vertebrados

	Laboratorio de Enfermedades Arbovirales y Zoonóticas CES-UVG/CDC-CAP	POE #: WNV-IS010
		Revision #: 1
		Página: 1 de 5
		Fecha de Implementación: 10/03/2010
		Revisado/Actualizado:
Título:	PCR para identificación de ingestas sanguíneas de vertebrado	Aprobado por:
Elaborado por:	AL Ramírez y AS González-Reiche	

1 Propósito:

Identificar el hospedero (vertebrado) del contenido sanguíneo del abdomen de los zancudos alimentados como un tamizaje inicial.

2 Aplicación:

Los cebadores utilizados en esta reacción fueron diseñados para amplificar específicamente ADN mitocondrial del gen del citocromo b de vertebrados a partir de las ingestas sanguíneas de zancudos.

3 Principio:

Este PCR fue diseñado como un tamizaje inicial para utilizar en aplicaciones posteriores de identificación de especie como RFLP (1). Los cebadores amplifican una región interna del citocromo b de vertebrados, dando un producto de amplificación de 358 pb. Debido al alto número de copias por célula del genoma mitocondrial, este es un PCR robusto, ideal para concentraciones bajas de templado de ADN como las que se encuentran en las ingestas sanguíneas de los zancudos alimentados.

4 Referencias:

Revisar antes de realizar este procedimiento


4.1 Otros POEs:

[WNV-IS002](#) – Extracción de ADN con DNAzol

[WNV-IS003](#) – Extracción de ADN con Kit

[WNV-IS004](#) – PCR ND4 control de calidad

[WNV-IS008](#) – Electroforesis en gel de Agarosa

	Laboratorio de Enfermedades Arbovirales y Zoonóticas CES-UVG/CDC-CAP	POE #: WNV-IS010
		Revision #: 1
		Página: 2 de 5
		Fecha de Implementación: 10/03/2010
		Revisado/Actualizado:
Título:	PCR para identificación de ingestas sanguíneas de vertebrado	Aprobado por:
Elaborado por:	AL Ramírez y AS González-Reiche	

4.2 Documentos suplementarios:


1. Meece, J.K. Reynolds, C.E.; Stockwell, P.J.; Jenson, T.A.; Christensen, J.E. y K.D. Reed. 2005. Identification of mosquito bloodmeal source by terminal restriction fragment length polymorphism profile analysis of the cytochrome b gene. J. Med. Entomol. 42(4): 657-667.

5 Seguridad

- 5.1 Utilizar bata protectora y guantes desechables durante todo el procedimiento.

6 Equipos, materiales y reactivos:

- 6.1 ADN extraído de abdómenes de zancudos alimentados
- 6.2 ADN de vertebrado (ave, mamífero, reptil o anfibio)
- 6.3 Agua DEPC (Invitrogen)
- 6.4 Buffer de reacción 5X GoTaq® verde o sin color (Promega)
- 6.5 dNTPs 250 µM c/u
- 6.6 Cebador Forward (100pmol/µL):
BM1: 5' CCC CTC AGA ATG ATA TTT GTC CTC A3'
- 6.7 Cebador Reverse (100pmol/µL):
BM2: 5' CCA TCC AAC ATC TCA GCA TGA TGA AA 3'
- 6.8 Taq (GoTaq DNA Polymerase, Promega)
- 6.9 Hielo
- 6.10 Tubos para microcentrífuga de 1.5 mL o tubo cónico de 15 mL (según la cantidad de master mix a preparar)

	Laboratorio de Enfermedades Arbovirales y Zoonóticas CES-UVG/CDC-CAP	POE #: WNV-IS010
		Revision #: 1
		Página: 3 de 5
		Fecha de Implementación: 10/03/2010
		Revisado/Actualizado:
Título:	PCR para identificación de ingestas sanguíneas de vertebrado	Aprobado por:
Elaborado por:	AL Ramírez y AS González-Reiche	

- 6.11 Placas o tubos con tapadera, para PCR convencional
- 6.12 Gradilla fría, gradilla para placa y para master mix
- 6.13 Etanol al 70% para limpieza y desinfección
- 6.14 Puntas bloqueadas, estériles, libres de ARNasas y ADNasas, exclusivas de PCR (p1000, p200, p100, p20, p10)
- 6.15 Guantes, kimwipes, marcador permanente de punta fina, etc.


7 Procedimientos:

Preparación de materiales

- 7.1 Desinfectar el área de trabajo con etanol al 70% antes de comenzar a trabajar.
- 7.2 Desinfectar la campana de PCR y encender la luz UV por 10 min.
- 7.3 Descongelar las muestras de ADN y el control positivo sobre hielo.
- 7.4 Encender termociclador#3 para PCR convencional Nyx Technik y cargar el programa "MEECE"

Procedimiento PCR:

- 7.5 Preparar Master Mix dentro de la campana de PCR en suficiente cantidad para el número de muestras a procesar (Para el cálculo de volúmenes de Master mix, agregar una reacción por cada 10 muestras) incluir en el cálculo los controles positivos (ADN de cualquier vertebrado) y el control negativo (NTC):

	Laboratorio de Enfermedades Arbovirales y Zoonóticas CES-UVG/CDC-CAP	POE #: WNV-IS010
		Revision #: 1
		Página: 4 de 5
		Fecha de Implementación: 10/03/2010
		Revisado/Actualizado:
Título:	PCR para identificación de ingestas sanguíneas de vertebrado	Aprobado por:
Elaborado por:	AL Ramírez y AS González-Reiche	

Reactivo	1X	nX
5X	5.0 µL	
dNTPs	0.4 µL	
Forward	0.125 µL	
Reverse	0.125 µL	
Taq	1.0 Unidad	
dH ₂ O	para completar volumen de reacción de 25 µL*	
Templado (ADN)	1.0 µL controles, 2.0 µL muestra	

*Doblar el volumen en caso de PCR para secuenciación (Rxn de 50 µL)

- 7.6 Agregar 23 µL de Master mix a cada tubo o pozo de la placa sobre la gradilla fría.
- 7.7 Colocar los tubos o la placa de PCR en la gradilla plástica colocada sobre hielo.
- 7.8 Guardar los reactivos del Master Mix a -20°C
- 7.9 Fuera de la campana de PCR, agregar el templado de ADN, incluyendo los controles. Cerrar los tubos y colocar en el termociclador, para iniciar el programa de amplificación:

Paso	Temperatura	Tiempo
1	95°C	5 min
2	95°C	30 seg
3	50°C	50 seg
4	72°C	40 seg
5	Volver a pasos 2 a 4, 35X	
6	72°C	4 min
7	4°C	Hold

7.10

	Laboratorio de Enfermedades Arbovirales y Zoonóticas CES-UVG/CDC-CAP	POE #: WNV-IS010
		Revision #: 1
		Página: 5 de 5
		Fecha de Implementación: 10/03/2010
		Revisado/Actualizado:
Título:	PCR para identificación de ingestas sanguíneas de vertebrado	Aprobado por:
Elaborado por:	AL Ramírez y AS González-Reiche	

Almacenamiento y manejo de muestras:

- 7.11 Almacenar nuevamente los templados de ADN a -70°C . Los productos de PCR se almacenan a 4°C hasta que se realizar la electroforesis.
- 7.12 Visualizar los productos de amplificación en un Gel de Agarosa al 2% (Sección 9.1).

Limpieza y desinfección de materiales y área de trabajo:

- 7.13 Desinfectar el área de trabajo con etanol al 70%. Descartar puntas, y tubos utilizados en la bolsa de desechos biopeligroso.

8 Responsables:

Personal – Investigadores y estudiantes que realicen el procedimiento. Verificar que todo el material para realizar este POE esté completo. Esterilizar periódicamente tubos de 1.5 mL exclusivos para PCR en suficiente cantidad para realizar el procedimiento.

9 Manejo de registros:

Anotar en el cuaderno de laboratorio el número de muestras procesadas, el mapa si se trabajo con placa con el número de identificación de cada muestra. Anotar el detalle de los cálculos para la preparación de Master mix. Ingresar en la base de datos los resultados para cada muestra (K:\WNV\ArboEpiMosquitos Ingesta Sanguinea.mdb)