

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

Facultad de Ciencias y Humanidades



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

Trabajo de investigación presentado por
María de Lourdes Monzón Pineda
para optar al grado académico de Licenciada en Bioquímica y Microbiología

Guatemala

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

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

Facultad de Ciencias y Humanidades




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

Trabajo de investigación presentado por
María de Lourdes Monzón Pineda
para optar al grado académico de Licenciada en Bioquímica y Microbiología

Guatemala

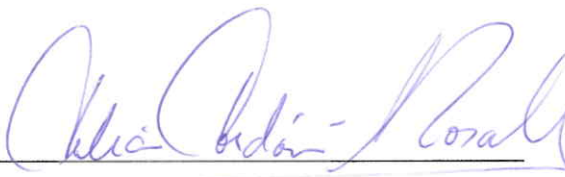
2007

Vo. Bo.

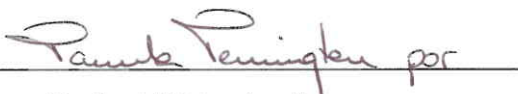
(f) 

Dra. María Eugenia Morales-Betoulle
Asesor principal

Tribunal:

(f) 

Licda. Celia Cerdón-Rosales
Asesor

(f) 

Dr. José Héctor Aguilar
Asesor

Fecha de aprobación: 15 de Junio de 2007

PREFACIO

Este estudio formó parte del Acuerdo Cooperativo CDC/WNV, el cual obtiene sus fondos de los Centros para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC por sus siglas en inglés). Bajo este proyecto (CDC/WNV) se están llevando a cabo investigaciones de diferentes arbovirus. Este estudio fue parte del componente ecológico de este proyecto.

Quiero agradecer al personal del equipo WNV ecología, del Centro de Estudios en Salud/CDC para Centro América y Panamá (CDC-CAP) y de la Universidad del Valle por el apoyo brindado. Especialmente a:

Ramón Medrano y Aquiles García por el muestreo de zancudos. Silvia Sosa, Bernarda Molina, Ana Catalán por la identificación de zancudos. María Reneé López, Ana Silvia González, Eduviges Molina por apoyo en el procesamiento de las muestras. Alejandra Estévez por su ayuda y sugerencias durante la estandarización de la técnica molecular para la detección de *Flavivirus*. José Roberto Ramírez por su ayuda en el manejo de datos. Sara Crawford (división DPD del CDC de Atlanta), Fredy Mejía y Luis Martínez por su gran ayuda en los análisis estadísticos.

Especialmente a mi asesora de tesis, Dra. María Eugenia Morales-Betoulle por permitirme formar parte de este proyecto, y ser parte fundamental en mi formación, tanto personal como profesional. A la Lda. Celia Cordon por ayudar a mi formación profesional y por ayudar a escoger mi punto de tesis. Al Dr. Héctor Aguilar por ser un excelente orientador y educador.

Al equipo de campo WNV: Shený, Danilo, Jean-Luc, Ramón, Aquiles, Alfonso y Luis; por hacer de los viajes de campo una experiencia agradable e inolvidable. Al Dr. Nicholas Komar y Nick Panella por su apoyo y sugerencias. A mis compañeras de laboratorio: Carmen Lucía, Ale E., Maria Reneé, Silvia, Ana Silvia, Claudia, Ana, Bernarda, Renata, Edu y Shený A; por que de una u otra manera me ayudaron a lo largo de mi tesis, y por darme apoyo para seguir adelante.

A las personas que me dieron apoyo técnico, en especial a Rosmery García, Estela de Flores, Byron Morales y Mónica Santiago.

También quiero agradecer: A Dios, por guiarme, darme fortaleza y brindarme múltiples oportunidades. A mis padres, Luis y Zury, a quienes dedico mi tesis por apoyarme en todas mis actividades y por ser un buen ejemplo. A mis hermanos, Alejandro, Luis y Andrea, y a mi sobrina Giulianna por confiar en mí y llenar mi vida de alegría.

CONTENIDO

PREFACIO	iv
LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE CUADROS	x
LISTA DE GRÁFICAS	xi
RESUMEN	xii

Capítulos	Página
I INTRODUCCIÓN	1
II ANTECEDENTES	3
A. Historia y Epidemiología de algunos <i>Flavivirus</i>	3
B. Características moleculares de los <i>Flavivirus</i>	5
1. <i>Flavivirus</i>	5
a. Estructura del genoma	5
b. Replicación	6
2. Virus del Oeste del Nilo	7
C. Transmisión y prevención	8
D. Vectores	9
1. <i>Culex quinquefasciatus</i>	9
a. Ecología	10
1) Distribución geográfica	10
2) Vías de invasión a nuevas localidades	10
3) Nutrición	10
4) Ciclo de vida	10
a) Huevo	11
b) Larva	12
c) Pupa	12

d) Adulto	13
b. Estrategias de control vectorial	13
1) Métodos físicos	13
2) Métodos químicos	13
3) Métodos biológicos	14
E. Métodos de colecta de zancudos del género <i>Culex</i>	14
1. Trampas de luz y dióxido de carbono	14
2. Trampas grávidas	15
F. Vigilancia ecológica del Virus del Oeste de Nilo en un foco de transmisión en Puerto Barrio, Izabal	16
III. JUSTIFICACIÓN	18
IV. OBJETIVOS	19
A. Objetivo general	19
B. Objetivos específicos	19
V. HIPÓTESIS	20
VI. MARCO METODOLÓGICO	21
A. Sitio de estudio	21
B. Muestreo y métodos de colecta	23
C. Identificación de zancudos capturados	23
D. Macerado de zancudos	23
E. Extracción de ARN viral	23
F. Detección del genoma viral por métodos moleculares	24
1. Detección de <i>Flavivirus</i>	24
a. Implementación de RT-PCR para la detección de <i>Flavivirus</i>	24
b. Utilización de la técnica implementada para la detección de <i>Flavivirus</i>	24
c. Electroforesis en gel de agarosa	24
2. Detección de VON	25
G. Análisis estadístico	26
VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	28
A. Análisis de la abundancia de <i>Culex quinquefasciatus</i> en el sitio de estudio	28

1.	Porcentaje de <i>Culex quinquefasciatus</i> por tipo de hábitat y su distribución por tipo de trampa y tipo de hábitat	28
2.	Análisis de la abundancia de <i>Culex quinquefasciatus</i> por tipo de hábitat y tipo de trampa	29
3.	Análisis correlativo de precipitación pluvial con la abundancia de <i>Culex quinquefasciatus</i>	33
a.	Correlación de la precipitación pluvial con la abundancia de <i>Culex quinquefasciatus</i> en cuadrantes urbanos	33
b.	Correlación de la precipitación pluvial con la abundancia de <i>Culex quinquefasciatus</i> en cuadrantes rurales	33
B.	Detección de <i>Flavivirus</i> en <i>Culex quinquefasciatus</i> por métodos moleculares	34
1.	Estandarización de RT-PCR para la detección de <i>Flavivirus</i>	34
2.	Detección molecular de <i>Flavivirus</i>	35
3.	Detección molecular del VON	38
C.	Análisis comparativo y correlativo de la tasa mínima de infección con <i>Flavivirus</i>	39
1.	Comparación de la tasa mínima de infección con <i>Flavivirus</i> por tipo de trampa	40
2.	Comparación de la tasa mínima de infección con <i>Flavivirus</i> por tipo de hábitat	41
3.	Correlación del mes de captura con la tasa mínima de infección con <i>Flavivirus</i>	42
4.	Correlación de la abundancia de <i>Culex quinquefasciatus</i> con la tasa mínima de infección con <i>Flavivirus</i>	44
VIII.	CONCLUSIONES	47
IX.	RECOMENDACIONES	48
X.	LITERATURA CITADA	49
XI.	ANEXOS	54
A.	Información de los pools de zancudos utilizados	55
B.	Información de los iniciadores utilizados para la amplificación de <i>Flavivirus</i> y VON	71
1.	<i>Flavivirus</i>	71
2.	VON	72
C.	Geles de agarosa de productos de amplificación e información de muestras positivas con la técnica molecular estandarizada	72

D. Resultados de los análisis estadísticos realizados en SAS 9.1	73
1. Análisis de la densidad relativa de <i>Culex quinquefasciatus</i>	73
a. Análisis de la densidad relativa por tipo de hábitat	73
b. Análisis de la densidad relativa por tipo de trampa	75
c. Análisis de la densidad relativa según el tipo de trampa en cuadrantes urbanos	77
d. Análisis de la densidad relativa según el tipo de trampa en cuadrantes rurales	80
e. Correlación de la precipitación pluvial con la densidad relativa de <i>Culex quinquefasciatus</i> en cuadrantes urbanos	83
f. Correlación de la precipitación pluvial con la densidad relativa de <i>Culex quinquefasciatus</i> en cuadrantes rurales	83
2. Análisis comparativo de la tasa mínima de infección con <i>Flavivirus</i> en <i>Culex quinquefasciatus</i>	84
a. Comparación de la tasa mínima de infección con <i>Flavivirus</i> por tipo de trampa	84
b. Comparación de la tasa mínima de infección con <i>Flavivirus</i> por tipo de hábitat	87
3. Correlación del mes de captura con la tasa mínima de infección con <i>Flavivirus</i>	90
4. Correlación de la densidad relativa de <i>Culex quinquefasciatus</i> con la tasa mínima de infección con <i>Flavivirus</i>	91
a. En cuadrantes rurales	91
b. En cuadrantes urbanos	91
E. Información del clima en Puerto Barrios en los meses de estudio	92

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Ciclo de transmisión del VON	5
2. Estructura del genoma de los <i>Flavivirus</i>	6
3. Replicación de los <i>Flavivirus</i>	7
4. Etapas requeridas para la infección por <i>Flavivirus</i> y su transmisión por un artrópodo	8
5. Hembra adulta de <i>Culex quinquefasciatus</i>	10
6. Ciclo de vida de <i>Culex quinquefasciatus</i>	11
7. Representación gráfica de una balsa de huevos	11
8. Representación gráfica de una larva en el cuarto estadio de <i>Culex quinquefasciatus</i>	12
9. Representación gráfica de una pupa	13
10. Fotografía de una trampa CDC de luz	15
11. Fotografía de una trampa grávida	16
12. Mapa de estudio de foco de transmisión	22
13. Principio de RT-PCR en tiempo real utilizando sondas específicas	25
14. Representación de una muestra positiva utilizando RT-PCR en tiempo real con sondas específicas	26
15. Estandarización de RT-PCR para la detección de <i>Flavivirus</i>	35
16. Tamizaje por RT-PCR para la detección de <i>Flavivirus</i>	36
17. Confirmación de pools positivos para <i>Flavivirus</i> por RT-PCR con primers FU1/cFD2	37
18. Detección del VON a partir de pools de <i>Culex quinquefasciatus</i> por RT-PCR en tiempo real	39
19. Organización del genoma de los <i>Flavivirus</i> y posición de los iniciadores en el genoma	71
20. Tamizaje por RT-PCR para la detección de <i>Flavivirus</i> (2)	72
21. Tamizaje por RT-PCR para la detección de <i>Flavivirus</i> (3)	73

LISTA DE CUADROS

Cuadro	Página
1. Clasificación de cuadrantes de estudio según tipo de hábitat	21
2. Información del mes de colecta, tipo de trampa y cuadrante en que fueron capturados los zancudos de los pools positivos	38
3. Número de pools de zancudos positivos por tipo de trampa y su respectiva tasa mínima de infección	40
4. Número de pools de zancudos positivos por tipo de hábitat y su respectiva tasa mínima de infección	42
5. Información de pools de zancudos utilizados	55
6. Información de los iniciadores consensos utilizados para la amplificación de <i>Flavivirus</i>	71
7. Información de los iniciadores y la sonda utilizados para la amplificación de VON	72
8. Información de los pools de zancudos positivos	74
9. Información del clima de Puerto Barrios en los meses de estudio	92

LISTA DE GRÁFICAS

Gráfica	Página
1. Porcentaje de <i>Culex quinquefasciatus</i> por cuadrante y tipo de hábitat	28
2. Abundancia de <i>Culex quinquefasciatus</i> según el tipo cuadrante	29
3. Abundancia de <i>Culex quinquefasciatus</i> según el tipo de trampa en los cuadrantes urbanos	30
4. Abundancia de <i>Culex quinquefasciatus</i> según el tipo de trampa en los cuadrantes rurales	31
5. Abundancia de <i>Culex quinquefasciatus</i> en áreas rurales y precipitación pluvial	32
6. Correlación del mes de captura con la tasa mínima de infección con <i>Flavivirus</i> en trampas CDC	43
7. Correlación del mes de captura con la tasa mínima de infección con <i>Flavivirus</i> en trampas grávidas	43
8. Correlación del mes de captura con la tasa mínima de infección con <i>Flavivirus</i> en cuadrantes urbanos	44
9. Correlación del mes de captura con la tasa mínima de infección con <i>Flavivirus</i> en cuadrantes rurales	44
10. Correlación de la densidad relativa de <i>Culex quinquefasciatus</i> con la tasa mínima de infección con <i>Flavivirus</i> en cuadrantes rurales	45
11. Correlación de la densidad relativa de <i>Culex quinquefasciatus</i> con la tasa mínima de infección con <i>Flavivirus</i> en cuadrantes urbanos	45

RESUMEN

Los *Flavivirus* (Familia *Flaviviridae*) son virus transmitidos por zancudos que causan morbilidad y mortalidad alrededor del mundo. Dentro de los *Flavivirus* más importantes se encuentran los virus de Fiebre Amarilla, Dengue, Virus de Encefalitis de San Luis y Virus del Oeste del Nilo. El Virus del Oeste del Nilo (VON) es causante de varias patologías incluyendo meningitis y encefalitis. Para comprender mejor la biología del VON y de otros *Flavivirus* transmitidos por zancudos, en este estudio se analizó la abundancia de zancudos de la especie *Culex quinquefasciatus* y la presencia de VON y otros *Flavivirus* en zancudos de dicha especie capturados en el 2006.

Al comparar la abundancia de los zancudos capturados en los diferentes sitios (rurales y urbanos) se encontró que en sitios rurales se capturan menos zancudos significativamente. Asimismo, al comparar la abundancia de los zancudos capturados con dos tipos de trampas (CDC y grávida) se encontró que no existe diferencia significativa en la eficiencia de ambos tipos para capturar *Culex quinquefasciatus*.

Para la detección de *Flavivirus* en *Culex quinquefasciatus* se estandarizó una técnica molecular utilizando los iniciadores específicos para *Flavivirus* FU2 y cFD3, la cual se utilizó como primer tamizaje. El segundo tamizaje se realizó utilizando los iniciadores FU1 y cFD2. Se detectó amplificación del genoma de *Flavivirus* en 9 grupos o “pools” de zancudos. Para la detección de VON en *Culex quinquefasciatus* se utilizó la técnica de TaqMan, con la cual no se encontró ningún positivo.

Al analizar los resultados moleculares (tasa mínima de infección) se encontró que no existe diferencia significativa en la infección por *Flavivirus* en *Culex quinquefasciatus* por tipo de hábitat y por tipo de trampa. Los resultados del análisis de la tasa mínima de infección en el tiempo podrían sugerir que la transmisión por *Flavivirus* en *Culex quinquefasciatus* de Puerto Barrios tiene cierta estacionalidad.

En general, los resultados obtenidos proveen herramientas para definir mejor la biología de los *Flavivirus* que circulan en *Culex quinquefasciatus* de Puerto Barrios. En caso de identificar a *Culex quinquefasciatus* como vector de algún *Flavivirus* potencialmente peligroso para la salud humana o animal, se pueden implementar estrategias específicas de control vectorial.

I. INTRODUCCIÓN

Dentro de los virus causantes de múltiples enfermedades a humanos y otros vertebrados, se encuentran los arbovirus (en inglés “arthropod-borne virus”). Se denominan de tal manera, ya que su transmisión es a través de artrópodos que se alimentan de sangre (zancudos, garrapatas, etc.). Estos artrópodos mantienen los virus en la naturaleza transmitiéndolos a hospederos susceptibles. Los arbovirus que pueden causar encefalitis humana pertenecen a las familias *Flaviviridae*, *Togaviridae* y *Bunyaviridae* (CDC, 2005 [a]).

Los *Flavivirus* pertenecen a la familia *Flaviviridae*. Su genoma es de ARN de simple hebra positiva. Entre estos, los virus más importantes causantes de morbilidad y mortalidad alrededor del mundo, son los virus de Fiebre Amarilla, Dengue, Virus de Encefalitis de San Luis y Virus del Oeste del Nilo (Burke y Monath, 2001).

El Virus del Oeste del Nilo (VON) es causante de varias patologías, incluyendo meningitis, encefalitis y en casos extremos, la muerte. En los años 90, la distribución geográfica del virus estaba limitada a África, el medio oriente, India y Asia, con epidemias ocasionales en Europa. En 1999, causó un brote en Nueva York, Estados Unidos. Para diciembre del 2002, el virus se había expandido a casi todo el país. En los años posteriores, continuó expandiéndose, llegando a México, El Caribe y El Salvador (Davis, *et. al.* 2003).

A partir del 2003, se realizaron estudios en Guatemala, para detectar la presencia del VON en varios departamentos (Morales-Betoulle, *et.al.* 2006). Gracias a estos estudios, se detectó la circulación del VON en el departamento de Izabal. En el 2006, se comenzó un nuevo estudio basado en la hipótesis de un posible foco de transmisión en el municipio de Puerto Barrios, en este mismo departamento. A pesar de tener evidencia serológica de la circulación del virus en el municipio de Puerto Barrios, aún no se ha detectado en zancudos. Por consiguiente, aún no se ha identificado el o los posibles vectores del VON.

En Estados Unidos, varias especies del género *Culex* son vectores principales del VON. Entre ellos se encuentran: *Culex quinquefasciatus*, *Culex pipiens* y *Culex restuans* (Petersen y Marfin, 2002). *Culex quinquefasciatus* es una especie con distribución geográfica amplia. Además, es un vector importante de algunos arbovirus y de ciertas filiarisis (NSW, 1996).

Por otro lado, es importante comprender la biología y el ciclo de transmisión de los virus dañinos para proteger la salud humana y animal. Para ello, se debe conocer el o los vectores potenciales del virus. Algunos factores tales como las densidades de poblaciones de zancudos, las preferencias de alimentación, la capacidad del vector para infectarse y transmitir el virus, necesitan ser estudiados para determinar el papel de una determinada especie en la transmisión del virus (Turell, *et. al.* 2001).

Para comprender mejor la biología del VON y de otros *Flavivirus* transmitidos por zancudos, se desea estudiar la abundancia de las poblaciones de *Culex quinquefasciatus*, así como también la presencia del VON y otros *Flavivirus* en *Culex quinquefasciatus* capturados en el 2006 dentro del estudio del foco de transmisión. Y de esta manera, lograr asociar a dicha especie como vector potencial del VON y de otros *Flavivirus*.

II. ANTECEDENTES

A. Historia y epidemiología de algunos *Flavivirus*

El género *Flavivirus* está compuesto de más de 70 virus. De estos, 40 virus han sido asociados con enfermedades humanas, tales como el Virus de Dengue, Virus del Oeste del Nilo (VON), Virus de Fiebre Amarilla, Virus de Encefalitis Japonesa y Virus de Encefalitis de San Luis (Burke y Monath, 2001). Dentro de los *Flavivirus* que circulan en Centro América se encuentran el Virus Jutiapa, el Virus de Encefalitis de San Luis, el dengue y el VON. Estos dos últimos han sido de preocupación para la salud pública en diferentes localidades en todo el mundo (Kuno, *et. al.* 1998).

El Virus Jutiapa lleva ese nombre porque fue aislado en 1969 en el departamento de Jutiapa, en Guatemala. No se conoce el vector, pero se aisló a partir de roedores. No se ha observado hasta el momento ningún caso de patología en humanos, y por eso no ha sido de tanto interés ni ha sido estudiado a profundidad. A pesar de esto, se ha observado en varias investigaciones que puede causar la muerte en roedores recién nacidos (Karabatsos, 1985).

El Virus de Encefalitis de San Luis es un virus transmitido por zancudos. Antes de la introducción del VON a Norte América, era el *Flavivirus* de mayor importancia médica en Estados Unidos. Se aisló por primera vez en 1933 (en St. Louis, Missouri). Este virus circula en Centro América y en América del Sur, generalmente en aves. Los casos de enfermedad humana son raramente observados en estas regiones (Shroyer, 2004).

El Dengue se había mantenido como enfermedad endémica en algunos países de Asia antes de la Segunda Guerra Mundial. Fue aislado por primera vez en 1943 (OPS, 2000). A partir de 1944, se propagó a otras regiones del mundo; entre éstas, América. A finales del Siglo XX, en sus diferentes formas –dengue hemorrágico y síndrome de choque del dengue – afectaba cerca de 80 millones de personas al año (Kuno, *et.al.* 1998).

Para el año 2000, en Guatemala se notificaron 5,963 casos clínicos, en la semana epidemiológica 40. Se observó en este año, un aumento de 85% del número de casos clínicos notificados el año anterior en el mismo período. Durante el año 2000, se confirmaron 18 casos de dengue hemorrágico con seis defunciones y una tasa de letalidad de un 33%. Se observó una incidencia acumulada de 52.38 casos por 100,000. Para ese entonces, los departamentos más afectados eran Zacapa, Santa Rosa, Escuintla y El Progreso. Durante ese año, el serotipo DEN-2 fue el único aislado (OPS, 2000).

El VON ha sido causante de múltiples brotes de meningitis alrededor del mundo (Kuno, *et. al.* 1998). Fue aislado e identificado por primera vez en 1937 a partir de una persona infectada en la región del Oeste del Nilo en Uganda. Desde 1937, había causado brotes

infrecuentes relacionados principalmente a fiebres. Sin embargo, la frecuencia y la severidad en los síntomas aumentaron a mediados de los años 90. Hasta 1999, el virus se encontraba únicamente en el hemisferio este, con una amplia distribución en África, Asia, el Medio Oriente y Europa (Petersen y Marfin, 2002).

El primer brote causado por el VON en Estados Unidos fue en Nueva York, en 1999. En los años subsecuentes, el virus se expandió al este y norte, luego al sur y oeste del país. En los años posteriores continuó expandiéndose, llegando a Latino América y El Caribe. (Komar y Clark, 2006). La teoría de expansión del virus es que los principales hospederos introductorios son las aves migratorias. Esto es debido a que al final del verano aumentan los casos de enfermedad por VON en USA, que coinciden con la llegada de concentraciones elevadas de aves migratorias (Rapoole, *et. al.* 2000).

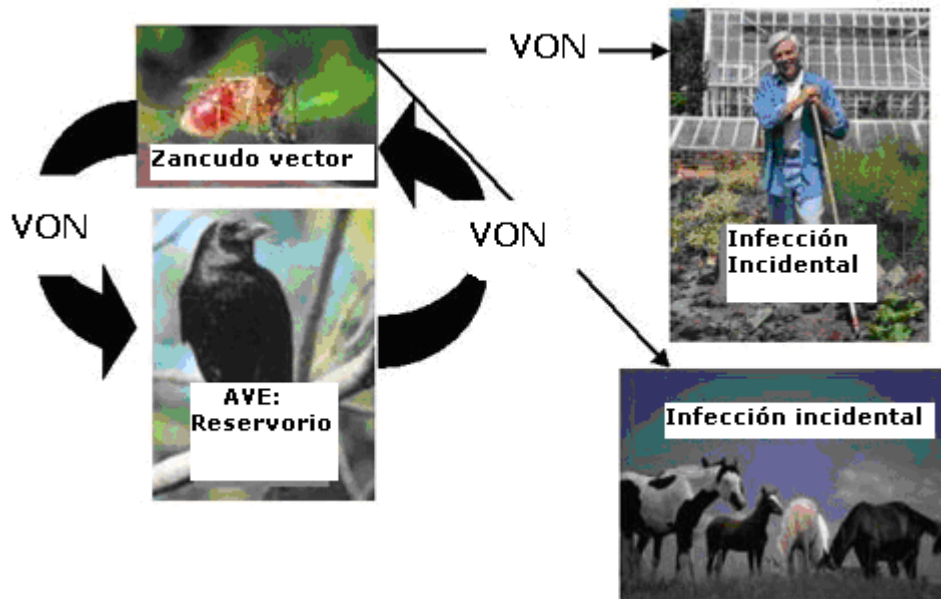
La mayoría de las infecciones humanas por VON son asintomáticas. La fiebre es el síntoma más común observado en humanos. Otros síntomas incluyen dolores de cabeza, dolor de cuerpo, anorexia, náusea, diarrea y debilidad muscular. Estos síntomas se observan en el 20% de los casos. Menos del 1% de los casos desarrollan la enfermedad neuroinvasiva, que comienza con encefalitis y/o meningitis, y resulta en parálisis, coma, y posteriormente la muerte. La mortalidad por la enfermedad neuroinvasiva es cerca del 10% (WHO, 2007).

El ciclo epidemiológico del VON se muestra en la Figura 1. Este ciclo comienza con la amplificación del virus en un ciclo ave-zanclado-ave, por medio de la picadura ocasional de un zancudo vector primario. El zancudo vector primario es un zancudo ornitófilo que mantiene el virus entre los reservorios naturales. Las aves son los reservorios naturales, es decir que amplifican el virus lo suficiente como para infectar a un zancudo vector en el momento de la picadura (Dauphin, *et. al.* 2004). Cuando las condiciones ambientales promueven la amplificación del virus, los zancudos vectores que sirven como puente de infección de los reservorios naturales a hospederos incidentales, se infectan con el virus y posteriormente transmiten el virus de aves a estos hospederos incidentales. Entre los hospederos incidentales se encuentran los humanos y otros mamíferos, como los equinos (Petersen y Marfin, 2002). Dentro de los factores ambientales que afectan el ciclo de amplificación, se encuentran: el clima, depredadores y parásitos del vector y del hospedero, así como también el estado inmunológico del hospedero.

Es importante conocer las características moleculares, y algunos factores ecológicos como la transmisión y la biología de los vectores para comprender mejor la biología y el ciclo de transmisión de los virus.

En la sección a continuación, se presentan las características moleculares de los *Flavivirus* en general y del VON específicamente

Figura 1. Ciclo de Transmisión del VON.



Comienza con un primer ciclo de amplificación del virus, zancudo (vector primario) – ave (reservorio natural). Cuando hay suficiente amplificación, un zancudo vector puente transmite el virus a los hospederos incidentales (equinos, humanos y otros mamíferos).

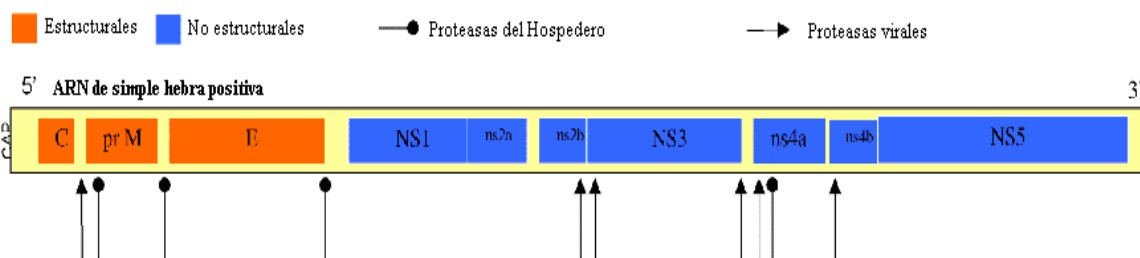
(Modificado de CDC, 2005 [b])

B. Características Moleculares de los *Flavivirus*

1. *Flavivirus*

a. Estructura del genoma: El genoma de los *Flavivirus* consiste en una simple hebra de ARN en sentido positivo (ver Figura 2). Además, consiste de 11,000 a 12,000 nucleótidos de longitud. El genoma codifica 10 proteínas funcionales, 3 estructurales y 7 no estructurales (Petersen y Roehrig, 2001). Durante la traducción, varias enzimas (proteasas) cortan el polipéptido generado en estas proteínas funcionales. Algunas de estas proteasas son proveídas por las células del hospedero (Brinton, 2002).

Dentro de las proteínas estructurales se encuentran la proteína de la cápside (C), de membrana (M) y de envoltura (E). La proteína M es sintetizada como una proteína precursora (prM). La proteína prM es procesada a pr + M durante la maduración del virus por una convertasa (furina). Las proteínas no estructurales son NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b y NS5, son proteasas, polimerasas, etc (Petersen y Roehrig, 2001).

Figura 2. Estructura del Genoma de los *Flavivirus*.

Es de ARN de simple hebra en sentido positivo. El extremo 5' codifica para las proteínas estructurales (C, prM y E), y el extremo 3' codifica para las proteínas no estructurales (NS1, NS2b, NS3, NS4a, NS4b y NS5).

(Modificado de Keen, 1999)

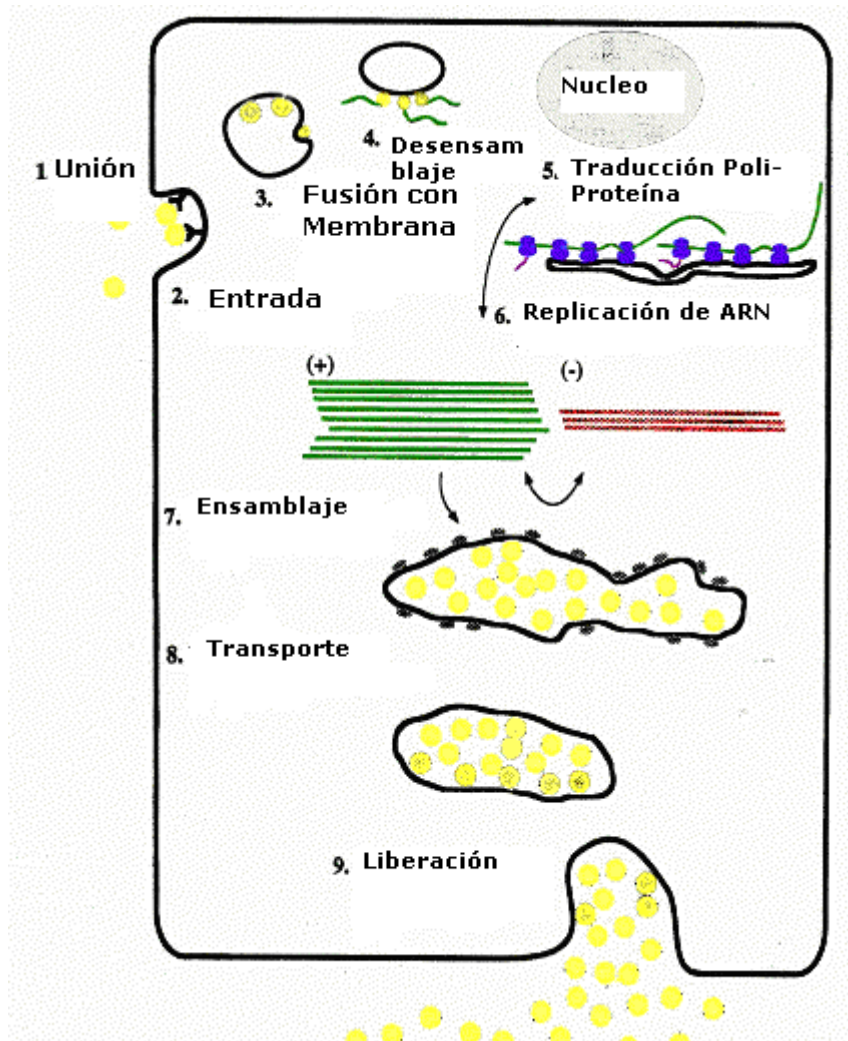
b. **Replicación:** La replicación de los *Flavivirus* se lleva a cabo en el citoplasma y dura 20 – 30 horas (Keen, 1999). El genoma es muy similar al ARN mensajero (mARN) excepto por la ausencia del extremo poli-adenilado (poli-A). Por esta razón, el virus es capaz de utilizar la maquinaria celular para la síntesis de las proteínas tanto estructurales, como no estructurales (Burke y Monath, 2001).

La unión y entrada (Figura 3.1 y 3.2) es por medio de una interacción de las proteínas E con receptores. La endocitosis está mediada por un receptor o se puede realizar por medio de la fusión directa de la envoltura a la membrana plasmática (Brinton, 2002). Estos receptores celulares aun no se conocen, pero deben de estar ampliamente distribuidos en el cuerpo en los sitios de infección con *Flavivirus* (Keen, 1999). Luego de la entrada a la célula, hay una acidificación de las vesículas pre-lisósomas, lo que permite la fusión con la membrana. La nucleocápside se libera al citoplasma por medio de un cambio en la conformación de la proteína E y posteriormente se realiza el desensamblaje del virión (Figura 3.3 y 3.4). El ribosoma celular es crucial para la replicación de los *Flavivirus*, ya que este traduce el ARN en una poliproteína (Figura 3.5) (Brinton, 2002).

Una vez traducida la poliproteína, ésta es cortada por una serie de proteasas, tanto virales como celulares, para generar polipéptidos. Uno de estos polipéptidos, es una polimerasa (proteína no estructural) encargada de sintetizar la hebra complementaria de ARN en sentido negativo (Figura 3.6). Esta hebra es utilizada como templado para la síntesis del ARN genómico de la progenie (Brinton, 2002).

Subsecuentemente, las partículas virales son ensambladas en las vacuolas del citoplasma. Se sintetiza y acumula la envoltura y ocurre la lisis celular (Figura 3.7 – 3.9) (Brinton, 2002).

Figura 3. Replicación de los *Flavivirus*.



El virus entra a la célula por la interacción de la proteína E con receptores de membrana (1 y 2). Se fusiona con la membrana (3), y la nucleocápside se libera al citoplasma y se realiza el desensamblaje del virión (4). El ribosoma traduce el ARN en una sola poliproteína (5), y la polimerasa sintetiza la hebra complementaria en sentido negativo (6). Las partículas virales son ensambladas (7), se sintetiza y acumula la envoltura y ocurre la lisis celular (8 y 9).

(Modificado de Burke y Monath, 2001)

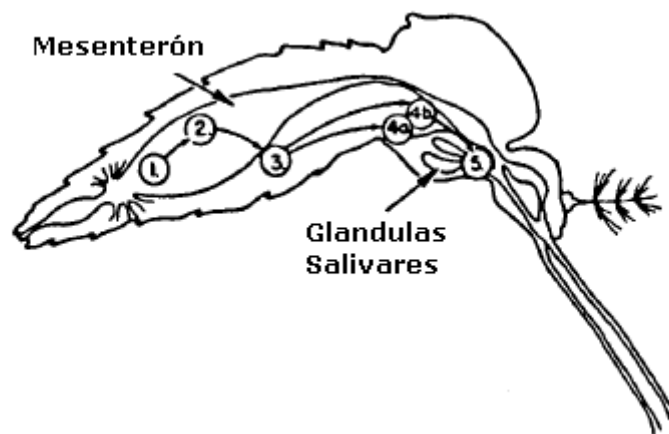
2. **Virus del Oeste del Nilo:** Los viriones del VON tienen ~ 50 nm de diámetro, son esféricos y envueltos. La nucleocápside tiene un diámetro de 25 nm y está compuesta de múltiples copias de la proteína C (Brinton, 2002).

Como típico miembro del género *Flavivirus*, el Virus del Oeste del Nilo (VON) es un virus de ARN de simple hebra en sentido positivo. El genoma tiene una longitud de 11,029 nucleótidos y contiene un solo marco abierto de lectura de 10,301 nucleótidos (Brinton, 2002). La estructura del genoma y su replicación es la de un *Flavivirus* común (Ver páginas 6 -8).

C. Transmisión y prevención

Una de las características más importantes para la transmisión viral es su capacidad de reproducirse en su vector, ya que sin ella no podrían ser transmitidos de un hospedero a otro (Keen, 1999). Las etapas para la transmisión biológica de los *Flavivirus* se resumen en la Figura 4: 1) Ingestión de sangre que contiene el virus; 2) Infección de las células epiteliales en el mesenterón; 3) Escape del virus de las células del mesenterón; 4) Infección de las glándulas salivares, y; 5) Secreción del virus en la saliva durante la realimentación en un hospedero susceptible (Burke y Monath, 2001).

Figura 4. Etapas requeridas para la infección con *Flavivirus* y su transmisión por un artrópodo.



El artrópodo ingiere sangre que contiene el virus (1). Las células epiteliales en el mesenterón se infectan (2). El virus escapa de las células del mesenterón (3). Las glándulas salivares del artrópodo se infectan (4). El artrópodo secreta el virus en la saliva durante la realimentación en un hospedero susceptible (5).

(Modificado de Burke y Monath, 2001)

La clave para la prevención de la enfermedad humana y animal asociada al VON y otros *Flavivirus* es la respuesta apropiada a la información proveída por la vigilancia. Una vigilancia completa en el caso de las enfermedades arbovirales comprende: la vigilancia en aves, zancudos y en humanos (AMCA, 2005). También es importante enfocarse en los vectores, identificar sus criaderos y realizar un control a través de la captura de larvas y zancudos adultos. Para ello se debe saber cuál es el vector principal y conocer su biología (AMCA, 2005).

D. Vectores

De los 73 virus que comprende el género *Flavivirus*, 34 son transmitidos por zancudos, 17 por garrapatas, y 22 son agentes zoonóticos transmitidos (generalmente entre roedores y murciélagos) por un vector desconocido (Burke y Monath, 2001). El VON ha sido aislado de los zancudos del género *Culex*, *Aedes*, *Ochlerotatus*, *Anopheles* y otros, en Asia, África y Estados Unidos (Brinton, 2002). Sin embargo, los *Culex* son los más susceptibles a la infección por el VON. Probablemente, los vectores primarios (que amplifican el virus dentro de las poblaciones de aves) más importantes son *Culex pipiens*, *Culex restuans* y *Culex quinquefasciatus*, por su capacidad vectorial, tasas de infección y preferencias de alimentación (Zinser, *et. al.*, 2004; Virginia Arbovirus Plan, 2005). Sin embargo, los vectores puente entre aves y mamíferos no están bien identificados (Petersen y Marfin, 2002).

Culex quinquefasciatus representa una de las especies veterinaria y médicamente importante (ISSG, 2006) entre los zancudos. Es vector de algunos *Flavivirus* tales como el Virus de Encefalitis de San Luis en el este y sur de Norte América, el VON en el sur de Estados Unidos y Europa. Se considera un vector puente y primario extremadamente eficiente del VON. Además, también es vector de otros patógenos tales como *Wuchereria bancrofti* y malarias aviarias como *Plasmodium relictum* (ISSG, 2006). En Hawai, *Culex quinquefasciatus* es un vector ciclopropagativo (en el cual el patógeno experimenta un desarrollo y multiplicación adicional) de malarias aviarias, y un vector mecánico (en el cual el patógeno es acarreado en la patas y en la proboscis) de viruela aviar (ISSG, 2006).

A continuación se presentan las características morfológicas y biológicas de *Culex quinquefasciatus*.

1. *Culex quinquefasciatus*: La hembra adulta de *Culex quinquefasciatus* es de tamaño mediano (menor a 3/16 pulgadas de longitud). Son de color café y los tergos abdominales contienen escamas oscuras con bandas basales pálidas que se estrechan en los laterales. No tienen bandas blancas en las patas, excepto por un parche de escamas pálidas en la unión de la tibia con el primer tarsómero. La proboscis es oscura, pero contiene algunas escamas claras al centro en la parte inferior. El escudo contiene escamas finas doradas y de color bronce. Las alas contienen escamas oscuras y son venosas. Tiene palpos cortos y no tiene cerdas pre y post-espericulares (ISSG, 2006). En la Figura 5, se puede observar una fotografía de una hembra de *Culex quinquefasciatus*.

Figura 5. Hembra adulta de *Culex quinquefasciatus*.



(ISSG, 2006)

a. Ecología

1) Distribución geográfica: *Culex quinquefasciatus* tiene una distribución geográfica amplia. Es nativo de Norte América, pero se encuentra también a través de trópicos y subtrópicos, incluyendo todo el grupo de islas en el Pacífico (ISSG, 2006). Generalmente se asocia con lugares donde habitan humanos. Particularmente, se encuentra en áreas urbanas (NSW, 1996).

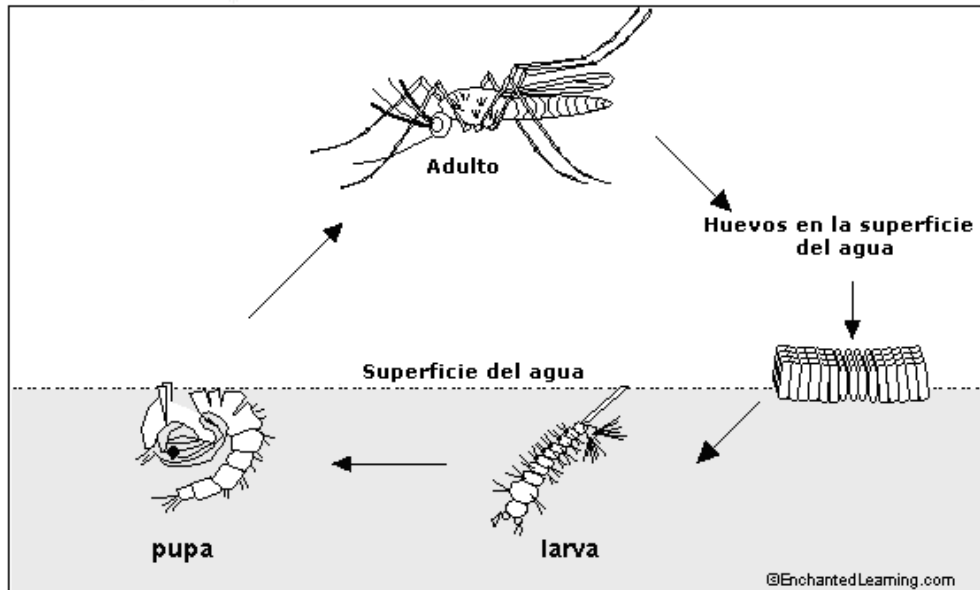
2) Vías de invasión a nuevas localidades: Existen varias vías de invasión del zancudo a nuevas localidades, entre ellas vía aérea, marítima y zancudos transportados por el viento. Por vía marítima se acarrean principalmente zancudos en etapas inmaduras de su ciclo de vida (Kilpatrick, *et.al.* 2004)

3) Nutrición: Información publicada en Estados Unidos, sugiere que *Culex quinquefasciatus* se alimenta principalmente de aves, y en un menor porcentaje de humanos (< 1% del tiempo). Otros estudios más recientes, sugieren que *Culex quinquefasciatus* se alimenta igualmente de humanos y aves. Otros análisis de ingesta sanguínea de ésta especie en dos sitios urbanos y un sitio boscoso, sugieren que los zancudos son oportunistas que se alimentan fácilmente de aves o humanos (ISSG, 2006). Usualmente se alimentan por la noche, ya sea en interiores o exteriores (NSW, 1996).

4) Ciclo de vida: El ciclo de vida de los zancudos está representado en la Figura 6 y consta de cuatro etapas: huevo, larva, pupa y adulto. Las hembras

necesitan alimentarse para obtener suficiente sangre, y así poder desarrollar sus huevos. *Culex quinquefasciatus*, al igual que todos los zancudos, necesita agua para completar su ciclo de vida, ya que es allí donde depositan sus huevos después de la ingesta sanguínea (Alameda Country Mosquito Abatement, 2007). *Culex quinquefasciatus* generalmente oviposita de 2 a 8 días después de alimentarse (Salazar y Moncada, 2004).

Figura 6. Ciclo de vida de *Culex quinquefasciatus*.



Consta de cuatro etapas: huevo, larva, pupa y adulto. Las primeras 3 etapas son acuáticas. (Modificado de Enchanted Learning Search, 2007)

a) Huevo: Los huevos son depositados uno a la vez en el agua y se unen unos con otros para formar una balsa de huevos, de 200 a 300 huevos. Los *Culex quinquefasciatus* depositan sus huevos por la noche en la superficie del agua. Prefieren ovipositar en recipientes, toneles, barriles, estanques ornamentales, piscinas, charcos, ríos o áreas pantanosas. Pueden depositar cada 3 tres noches durante su etapa adulta (Alameda Country Mosquito Abatement, 2007). Una balsa de huevos (Figura 7) se ve como una mancha de hollín flotando en el agua y mide $\frac{1}{4}$ de pulgada de largo y $\frac{1}{8}$ de pulgada de ancho. La mayoría de huevos maduran a larva de 24 a 48 horas (Alameda Country Mosquito Abatement, 2007).

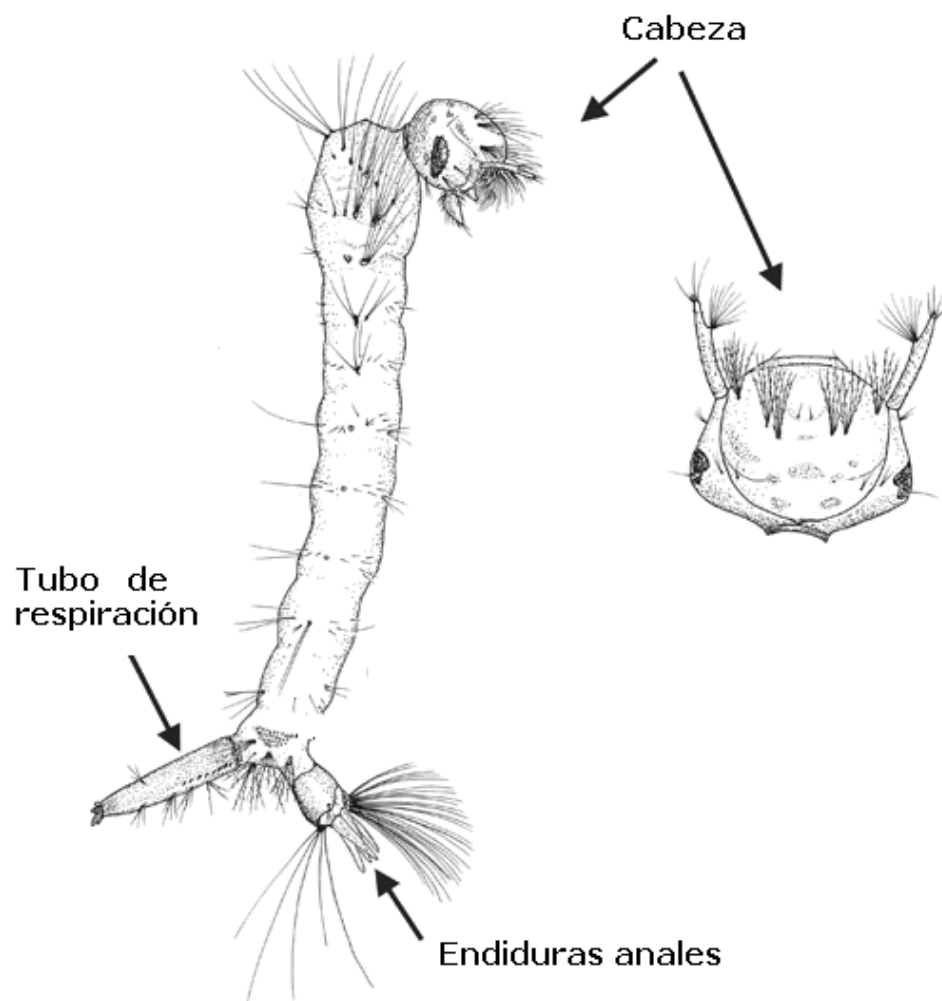
Figura 7. Representación gráfica de una balsa de huevos.



(Alameda Country Mosquito Abatement, 2007)

b) Larva: La larva vive en el agua y sale a la superficie para respirar por medio de un aparato parecido al tubo de respiración de los buzos. Se alimenta de microorganismos y materia orgánica en el agua. Viven de 7 a 14 días debajo del agua dependiendo de la temperatura del agua (Alameda Country Mosquito Abatement, 2007). Las larvas mudan su piel cuatro veces y crecen después de cada muda. Las etapas dentro de cada muda se llaman estadios (Alameda Country Mosquito Abatement, 2007). El cuarto estadio se representa en la Figura 8, y llega a medir hasta ½ pulgada. Después de la cuarta muda, se convierten en pupa (Jarratt, *et. al.* 2004).

Figura 8. Representación gráfica de una larva en el cuarto estadio de *Culex quinquefasciatus*.



(Modificado de Jarratt, *et. al.* 2004)

c) Pupa: La pupa (Figura 9) vive en el agua de 1 a 4 días antes de convertirse en adulto. Es menos densa que el agua, y por tal razón flota en el agua. Es una etapa de reposo, pero existen momentos en los que se inquieta, salta y vuelve a reposar en la superficie del agua. La pupa no se alimenta, únicamente toma oxígeno

por medio de dos tubos de respiración llamados “trompetas”. Después de la maduración completa de la pupa, emerge el zancudo adulto y reposa en la superficie del agua hasta que su cuerpo esté completamente seco (Alameda Country Mosquito Abatement, 2007).

Figura 9. Representación gráfica de una pupa.



(Alameda Country Mosquito Abatement, 2007)

d) Adulto: Varios días después de emerger como adulto, la hembra comienza a buscar fuentes de alimentación, ya sea aves o mamíferos. El tiempo de vida de los zancudos depende de varios factores, tales como humedad, temperatura, tiempo del año y sexo del zancudo (Alameda Country Mosquito Abatement, 2007). El macho generalmente vive acerca de una semana. La vida de la hembra depende de los otros factores, pero generalmente vive de 30 a 64 días (Kilpatrick, *et. al.* 2004).

Culex quinquefasciatus, y en general todos los zancudos del género *Culex*, no viajan muy lejos de sus criaderos, aunque pueden viajar hasta 2 millas. Además, viven solo unas pocas semanas en los meses más cálidos del verano. Sin embargo, son más activos durante estos meses, ya que el calor hace que las hembras busquen agua en donde depositar sus huevos (Alameda Country Mosquito Abatement, 2007). Al contrario, en épocas de lluvia disminuye la oviposición (O’Meara, *et. al.* 1989). Además, se adaptan con facilidad a ambientes con altitudes altas (Salazar y Moncada, 2004).

b. Estrategias de control vectorial

1) Métodos físicos: La reducción de sitios en donde los zancudos puedan hacer sus criaderos – aguas estancadas, etc. – ayuda a reducir las poblaciones de zancudos (ISSG, 2006).

2) Métodos químicos: El método más comúnmente utilizado para el control de zancudos vectores es la aplicación de insecticidas. Sin embargo, los mosquitos desarrollan diversos mecanismos de resistencia a esos insecticidas. *Culex quinquefasciatus* y otros miembros del complejo *Culex pipiens*, tienen una reputación sobresaliente por su capacidad de desarrollar resistencia a ciertos insecticidas. Entre estos insecticidas se encuentran organofosforados, carbamatos y piretroides. Cuando el control vectorial por medio de insecticidas no es efectivo (debido a la evolución de cepas resistentes), la solución es aumentar la dosis o el uso de un insecticida diferente (ISSG, 2006).

En Guatemala, generalmente se utiliza deltametrina como adulticida en aplicación intradomiciliar para el control de la malaria. Sin embargo, *Culex quinquefasciatus* es resistente a deltametrina y otros métodos químicos de control vectorial (González, *et.al.* 1999).

3) Métodos biológicos: Debido al desarrollo de resistencia a insecticidas (Salazar y Moncada, 2004), la expansión de genes de resistencia entre los miembros del complejo *Culex pipiens* a través de los continentes se ha convertido en una aplicación considerable y de interés científico básico (ISSG, 2006).

La bacteria *Bacillus thuringiensis* se descubrió a mediados de los 1970s en Israel, y se demostró que era eficiente para el control de larvas de varias especies de zancudos. Esta eficacia contribuyó al desarrollo de BTI como ingrediente activo para larvicidas bacterianos comerciales. Estos larvicidas son utilizados actualmente en programas de control vectorial en todo el mundo. Y a pesar de ser utilizado en múltiples de estos programas, no se ha reportado resistencia a BTI (ISSG, 2006).

Los larvicidas bacterianos basados en formulaciones comerciales de *B. sphaericus* 2362 son utilizados en varios países. Sin embargo, en algunos de estos países se ha reportado que poblaciones de *Culex quinquefasciatus* son resistentes a *B. sphaericus* 2362. En 1999, Wirth Walton y Frederici, descubrieron que añadiendo Cyt1A (proteína de *Bacillus thuringiensis* subsp. *Israelensis*) a una razón de 1:10 a los larvicidas de *B. sphaericus*, restauraba la toxicidad incluso a las poblaciones altamente resistentes de *Culex quinquefasciatus*. De tal manera que, Cyt1A provee una herramienta práctica para el manejo de resistencia a *B. sphaericus* (ISSG, 2006).

E. Métodos de colecta de zancudos del género *Culex*

1. Trampas de luz y dióxido de carbono: Inicialmente se utilizaban trampas convencionales con cebo de luz únicamente, siendo la más común la tipo CDC (Figura 10). Sin embargo, Reeves y Hammon (1942) propusieron la adición de dióxido de carbono para incrementar la captura de zancudos. Actualmente, con el aumento de la disponibilidad de hielo seco, fuente de CO₂, se utiliza éste como cebo en trampas CDC de luz en muchos programas de vigilancia. Esta estrategia de agregar hielo seco a trampas de luz, aumenta la captura de zancudos de 4 a 6 veces y el número de especies capturadas en un 19-25 % más que en trampas de luz sin cebo. Otro de los beneficios de la incorporación de hielo seco a trampas de luz es que lugar donde se coloca la trampa no es crítico para asegurar una buena captura (Service, 1993). Sin embargo, existen algunas recomendaciones para la colocación de las trampas, siendo las más importantes colocar la trampa cerca de posibles áreas de reposo de zancudos, lejos de posibles competencias (ej.: luces), y lejos de áreas

donde se genere humo y/o con mucho viento (tomado de <http://www.cdphe.state.co.us/dc/Zoonosis/wnv/MosqCollect.pdf>).

Se ha demostrado en otras localidades geográficas que la utilización de cebo de CO₂ además de la luz en las trampas CDC permite incrementar la cantidad total de zancudos capturados, obtener una mayor diversidad de especies y aumenta la probabilidad de obtener aislados virales (Leake, *et al.*, 1986).

Las trampas CDC con cebo de luz y CO₂ son utilizadas esencialmente para capturar zancudos en busca de alimentación, sin embargo estas capturan también zancudos alimentados (1-8 %). Aunque son efectivas y comúnmente utilizadas, un punto limitante de estas trampas es que no necesariamente atraen a todas las especies del género *Culex*. Por lo tanto se debe tomar en cuenta que algunas poblaciones de zancudos pueden estar sub-representadas cuando se usa este tipo de trampa (Allan y Kline, 2004).

Figura 10. Fotografía de una trampa CDC de Luz



(New York State Department of Health)

2. Trampas grávidas: Se necesita al menos dos ciclos completos de alimentación y oviposición para que un zancudo adquiera un patógeno y lo pueda transmitir. Se ha demostrado que las posibilidades de detección de arbovirus son significativamente mayores en hembras grávidas (Allan y Kline, 2004). Por lo tanto, es recomendado para detectar infección viral utilizar hembras grávidas para obtener un mejor estimado de las poblaciones infectivas (Braks y Cardé, 2007).

La trampa grávida CDC (Figura 11) es la más utilizada para capturar especies del género *Culex*. Estas atraen especialmente hembras en busca de sitios para ovipositar, en general sitios que contienen grandes cantidades de materia orgánica en agua (Reiter, 1983; Reiter, 1987). Ha sido reportado que estas trampas capturan de 57-95 % de hembras grávidas (Allan y Kline, 2004) y 88 veces más *Culex* que otras trampas (Service, 1993).

Figura 11. Fotografía de una trampa grávida.



(National Park Service)

F. Vigilancia ecológica del Virus del Oeste de Nilo en un foco de transmisión en Puerto Barrios, Izabal

En años anteriores, se realizaron estudios para detectar el Virus del Oeste del Nilo (VON) y otros *Flavivirus*, en varios departamentos de Guatemala. En estos estudios, se detectó la circulación del VON en el departamento de Izabal por medio de serología en aves. En el año 2006 se comenzó un nuevo estudio basado en la hipótesis de un posible foco de transmisión en el departamento de Izabal.

En el año 2006, con el fin de estudiar la biología del VON en Guatemala y establecer modelos de vigilancia ecológica aplicables a regiones similares, se diseñó un estudio denominado “Vigilancia Ecológica del VON en un Foco de Transmisión” en el Municipio de Puerto Barrios, Departamento de Izabal. Los componentes de este estudio comprenden: la vigilancia serológica en aves centinelas para determinar la estacionalidad en la transmisión del virus; encuestas serológicas en aves silvestres para identificar los reservorios naturales; conteos de aves presentes en el sitio de estudio para estimar la densidad relativa de aves silvestres y domésticas en el sitio de estudio; captura e identificación de especies de zancudos

y detección y caracterización en laboratorio de *Flavivirus* en los zancudos capturados para identificar los posibles vectores de estos virus.

Esto último se realiza sabiendo que, para implicar a una determinada especie de zancudo como vector de un determinado *Flavivirus*, se debe considerar: 1) las densidades de la población de la especie en cuestión; 2) demostrar la presencia del virus en zancudos capturados en el campo; 3) la especie de zancudo en cuestión debe ser susceptible a la infección del virus, capaz de amplificarlo y transmitirlo en condiciones controladas de laboratorio (competencia vectorial); 4) el zancudo se debe alimentar del potencial hospedero amplificador en la naturaleza; y 5) debe existir una asociación entre la abundancia del zancudo y la transmisión del virus en la naturaleza (Anderson, R. y L. Harrington, sitio de internet). En este estudio fueron analizados los dos primeros indicadores mencionados: densidades de zancudos y presencia de *Flavivirus* en estos mismos.

III. JUSTIFICACIÓN

El VON y los *Flavivirus* en general, han sido causantes de muchas enfermedades y muertes alrededor del mundo. Uno de los métodos para la prevención de enfermedades arbovirales, es la vigilancia ecológica del patógeno y la eliminación de posibles criaderos de vectores (AMCA, 2005). Para ello es importante conocer el vector principal de la enfermedad. En los estudios anteriores realizados en Guatemala, no se ha podido identificar el o los vectores potenciales del VON, a pesar de la evidencia serológica que se tiene de la circulación del virus (Morales-Betoulle, *et. al.* 2006).

En estudios realizados en Estados Unidos, las tasas mínimas de infección por VON reportadas para las poblaciones de *Culex quinquefasciatus* van desde 1.29 hasta 8.09 (Komar y Clark, 2006; Reisen, 2005). Además, se ha reportado como vector principal de algunos arbovirus y de ciertas filiarisis (NSW, 1996).

Por las razones anteriormente mencionadas, se decidió estudiar la densidad relativa de las poblaciones de *Culex quinquefasciatus*, así como también la presencia y tasa mínima de infección del VON y otros *Flavivirus* en *Culex quinquefasciatus* capturados en el 2006 dentro del estudio del foco de transmisión. Lo anterior, con el objeto de comprender mejor la biología del VON y de otros *Flavivirus*, y poder asociar a *Culex quinquefasciatus* como vector potencial de estos virus.

Dentro de los estudios en Guatemala, basados en la vigilancia ecológica del VON y de otros *Flavivirus*, se han observado ciertos problemas para la detección de *Flavivirus* con la técnica que se utiliza (transcriptasa reversa - reacción en cadena de la polimerasa [RT-PCR] estándar); entre ellos, falsos positivos y precios elevados. Debido a ello, se estandarizó un RT-PCR adecuado para la detección de *Flavivirus*. Por otro lado, en los dos tipos de trampas utilizadas en este estudio (CDC y grávidas), se espera capturar zancudos en diferentes etapas de su ciclo de vida y de alimentación. Por tal razón, es importante comparar los resultados obtenidos a partir de los zancudos capturados por los distintos métodos de colecta. Finalmente, el hábitat de los vectores de enfermedades arbovirales juega un papel importante en la distribución de estas mismas. Por lo tanto, también es importante comparar los resultados obtenidos en los dos tipos de hábitat (rural y urbano).

IV. OBJETIVOS

A. Objetivo general

Estudiar la abundancia de las poblaciones de *Culex quinquefasciatus*, así como también la presencia del VON y otros *Flavivirus* en *Culex quinquefasciatus* capturados en el 2006 dentro del estudio del foco de transmisión, para asociar a dicha especie como vector potencial de estos virus.

B. Objetivos específicos

1. Analizar la abundancia de *Culex quinquefasciatus* en el foco de transmisión y comparar los resultados por tipo de hábitat y por tipo de trampa.
2. Analizar la asociación de la abundancia de *Culex quinquefasciatus* con la precipitación pluvial.
3. Implementar en Guatemala una técnica molecular adecuada para la detección de *Flavivirus*.
4. Detectar la presencia de VON y *Flavivirus* en las poblaciones de *Culex quinquefasciatus* en el municipio de Puerto Barrios, con la técnica implementada.
5. Analizar la asociación de la presencia de *Flavivirus* en *Culex quinquefasciatus* con el mes y la abundancia de *Culex quinquefasciatus*

V. HIPÓTESIS

1. Existen diferencias significativas en la abundancia de los *Culex quinquefasciatus* capturados en los dos diferentes tipos de trampas y tipos de hábitat.
2. Existe una correlación significativa entre la abundancia de *Culex quinquefasciatus* y la precipitación pluvial.
3. Existen diferencias significativas en la presencia de *Flavivirus* en los *Culex quinquefasciatus* capturados en los dos diferentes tipos de trampas y tipos de hábitat.
4. Existe una correlación significativa entre la presencia de *Flavivirus* en *Culex quinquefasciatus* y el mes de captura.
5. Existe una correlación significativa entre la presencia de *Flavivirus* en *Culex quinquefasciatus* y la abundancia de *Culex quinquefasciatus*.

VI. MARCO METODOLÓGICO

A. Sitio de estudio

El área de estudio cubre 80 Kms² del municipio de Puerto Barrios en donde se había reportado la presencia del VON por serología. Al inicio del estudio, se escogieron al azar (en lugares con rutas de acceso, que contaran con casas y seguros para los investigadores) 10 sitios o cuadrantes en los cuales se realiza el muestreo de aves centinelas y la captura de zancudos.

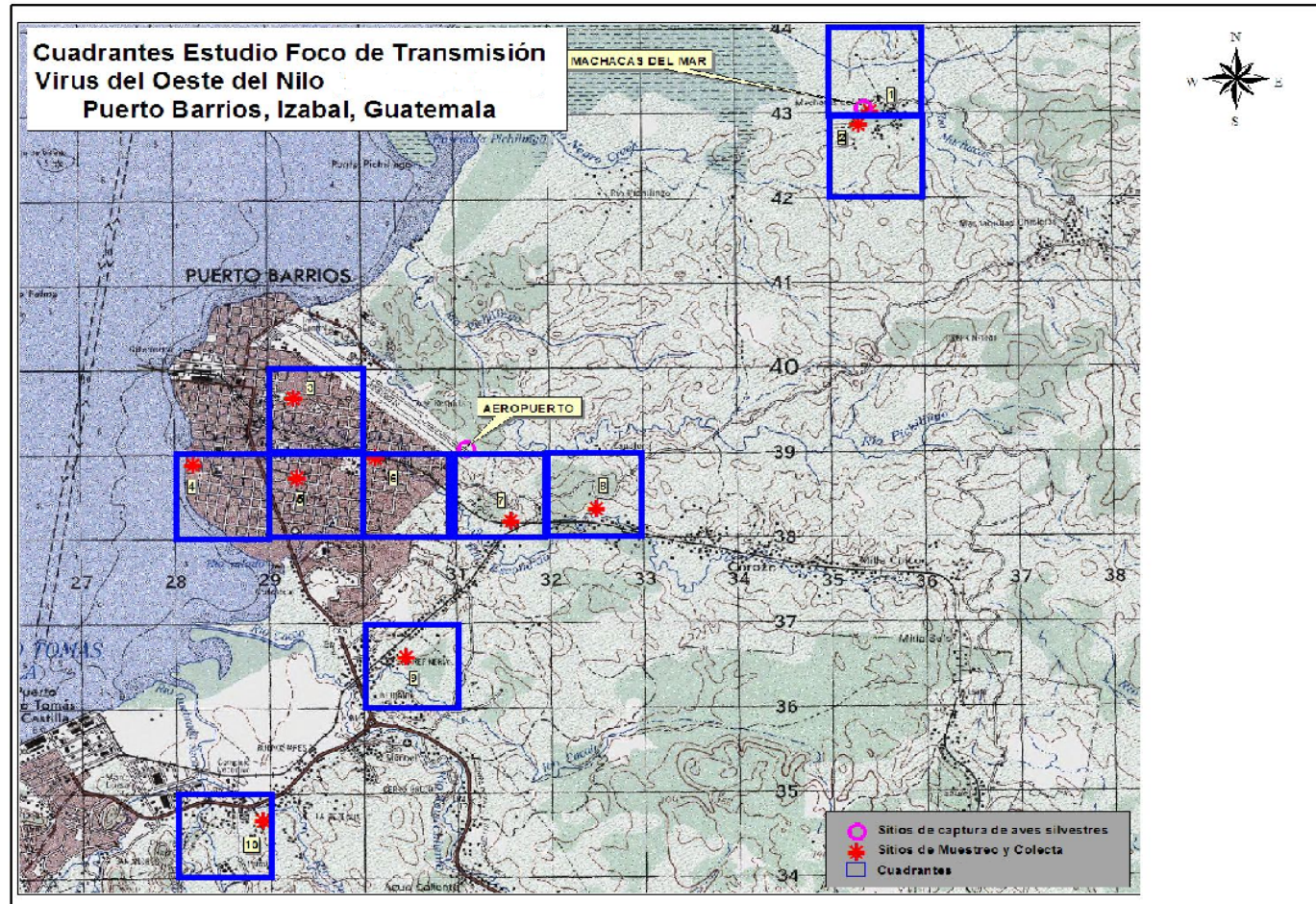
Este municipio está ubicado en el Departamento de Izabal, Costa Caribe de Guatemala y cubre un área aproximada de 1,292 Km². Comprende una población total de alrededor de 81,000 habitantes, 40% del los cuales residen en el área rural. Su hábitat se caracteriza por ser una zona de vida con bosque húmedo subtropical, con condiciones climáticas correspondientes a un régimen húmedo y caliente, sin una estación de sequía bien definida.

En la Figura 12, se puede observar la ubicación de los 10 sitios de muestreo, los cuales se clasificaron como rural o urbano según el tipo de hábitat. Los distintos parámetros que se utilizaron para clasificar los cuadrantes según el tipo de hábitat se resumen en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Clasificación de cuadrantes de estudio según tipo de hábitat.

No. Cuadrante	% casas	% calle	% jardín	% guamil	% potrero soleado	% cerco vivo	Tipo de hábitat
1	10	10	48	0	30	2	Rural
2	10	10	20	40	10	10	Rural
3	0	10	60	30	0	0	Urbano
4	10	10	80	0	0	0	Urbano
5	35	15	50	0	0	0	Urbano
6	50	20	30	0	0	0	Urbano
7	40	15	45	0	0	0	Rural
8	50	15	35	0	0	0	Rural
9	25	15	60	0	0	0	Urbano
10	25	15	60	0	0	0	Urbano

Figura 12. Mapa de estudio de foco de transmisión.



(Modificado de Barrios, 2007)

B. Muestreo y métodos de colecta

Se realizaron colectas de zancudos de marzo a octubre de 2006 en los diez diferentes cuadrantes descritos en la sección anterior. Se utilizaron trampas CDC de luz y trampas grávidas. En cada sitio de trabajo se colocó 1 trampa de CDC de luz (John W.Hock Co., Gainesville, FL, USA) utilizando CO₂ (hielo seco) como cebo, y 1 trampa grávida (Reiter, 1983) con estiércol de vaca y agua como cebo. Las trampas se colocaron por la noche - una noche cada mes, exceptuando los meses marzo, junio y agosto en los cuales se colocaron dos noches. Los zancudos se guardaron en hielo seco (para matarlos) y se separaron de otros insectos. Se colocaron en tubos criogénicos (rotulados con lugar, fecha y tipo trampa) en grupos de ~ 50 individuos. Se transportaron al laboratorio en hielo seco. Se guardaron a -70° C hasta el momento de su identificación.

C. Identificación de zancudos capturados

La identificación de los *Culex quinquefasciatus* fue realizada por entomólogos especializados. La separación se realizó por fecha, sitio de captura, tipo de trampa, y sexo. Las hembras además, se clasificaron por alimentadas, vacías y grávidas, separando las grávidas y vacías (que se colocaron en un mismo grupo) de las alimentadas. A cada grupo o “pool” de zancudos, con no más de 50 individuos, se le asignó un código. Se guardaron a -70° C hasta el momento de su procesamiento.

D. Macerado de zancudos

A cada grupo o “pool” de zancudos colectado e identificado, se le agregó 1,750 µL de buffer BA-1 (Medio 199 - Sales de Hank 1X con L-Glutamina, Tris-HCl 0.05 M pH 7.5, albúmina sérico bovina 1% pH 7.0, L-Glutamina 2 mM, Bicarbonato de sodio 0.35 g/L, penicilina 100 u/mL, estreptomina 100 µg/L, y anfotericina B[Fungizona] 1 µg/mL) y un balín de cobre. Se utilizó un macerador eléctrico (Retsch, Newtown, PA) modelo MM 301, con el cual se agitó a 25 rpm por 4 minutos. Se centrifugó a 4000 rpm por 12 minutos. Se guardó cada “pool” en alícuotas de 750 µL a -70° C hasta el momento de extracción.

E. Extracción de ARN viral

Se extrajo ARN viral de los “pools” de zancudos utilizando el kit extracción “QIAamp viral RNA Mini Kit” (QIAGEN, Valencia, CA), siguiendo las especificaciones del fabricante. A 140 µL de macerado se agregaron 560 µL de solución tampón AVL y etanol al 100%. Esta solución se colocó en columnas de elusión y se sometió a varias centrifugaciones y varios lavados de 500 µL de soluciones tampón (AW1 y AW2). Posteriormente, el ARN se eluyó en un volumen final de 60 µL de solución tampón de elusión (AVE). Las columnas de elusión y todas las soluciones tampón que se utilizaron están incluidas en el kit (QIAGEN, Valencia, CA). Se utilizó agua libre de ARNasas como control negativo. Se guardó a -70° C.

F. Detección del genoma viral por métodos moleculares

Se utilizaron dos técnicas de la transcripción reversa- reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR), una para la detección de *Flavivirus* y otra para la detección del VON específicamente. A continuación se describen ambas técnicas.

1. Detección de *Flavivirus*: Debido a algunos problemas observados en la detección de *Flavivirus* (falsos positivos y precios elevados), se estandarizó una prueba molecular adecuada, es decir económica y eficiente para la detección de *Flavivirus*.

a. Implementación de RT-PCR para la detección de *Flavivirus*: En base a la bibliografía (Kuno *et. al.*, 1998), se escogió un par de iniciadores consensos para *Flavivirus*: FU2 (5'-GCT GAT GAC ACC GCC GGC TGG GAC AC- 3') y cFD3 (5'-AGC ATG TCT TCC GTG GTC ATC CA- 3'), que amplifican un fragmento de ~ 850 pares de bases (pb). Se probaron 3 kits con los iniciadores seleccionados: 1) "QuantiTect SYBR Green RT-PCR" (Qiagen, Valencia, CA), RT-PCR en un solo paso "One Step RT-PCR" (Qiagen, Valencia, CA), y "SuperScript II RT" (Invitrogen, Carlsbad, CA), seguido de "Taq DNA polymerase" (Invitrogen, Carlsbad, CA). Para el primero se usó como base un protocolo de R.S. Lanciotti modificado por B.W. Johnson (2004). Para los dos restantes se utilizaron como base los protocolos sugeridos por el fabricante. En todos los casos se cambiaron ciertas condiciones, principalmente la concentración de los iniciadores y la temperatura de hibridización, según lo requerido.

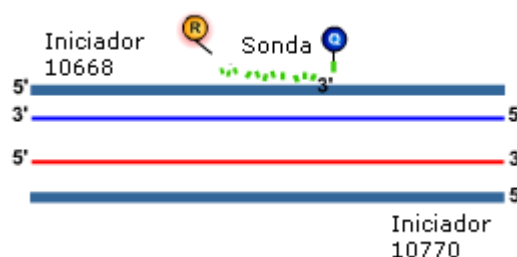
b. Utilización de la técnica implementada para la detección de *Flavivirus*: Se eligió el kit comercial, volumen final de reacción, concentración de reactivos y programa de termociclador más adecuados para la detección de *Flavivirus*. Se visualizaron los resultados por medio de una electroforesis en gel de agarosa.

c. Electroforesis en gel de agarosa: Se disolvieron 1.2 g de agarosa en 60 mL de solución tampón TBE (Tris – Borato – EDTA) 1X. Se calentó la solución hasta disolver completamente la agarosa y luego se dejó enfriar. Se agregaron 1.2 µL de bromuro de etidio 10 mg/mL. Se vertió en un molde con peines incrustados y se dejará polimerizar por 30 minutos. Se llenó la cámara de electroforesis "Run One" (Embitec, San Diego, CA) con TBE 1X y se colocó en ella el gel polimerizado. Se cargó en cada pozo 5 µL de cada producto de RT-PCR mezclado con 1 µL de solución tampón de montaje azul-naranja 6X (Promega, Madison, WI). En los pozos extremos se cargó 7 µL de marcador molecular (Promega, Madison, WI) de 100 pares de bases (pb) diluido de la siguiente manera: 1 µL de marcador molecular + 1 µL de solución tampón de montaje + 4 µL DEPC (Invitrogen, Carlsbad, CA). Se dejó correr las muestras a 50V por 1 hora 15 minutos. Las bandas se visualizaron en luz ultravioleta en un transluminador (UVP, Upland, CA) y se le tomó una fotografía con el software Grab-it.

2. Detección de VON: Se realizó por medio de RT-PCR en tiempo real utilizando sondas específicas. Se utilizó el kit comercial “TaqMan Probe RT - PCR” (Qiagen, Valencia, Ca). Se agregaron a la mezcla de reacción 15 pmol de los iniciadores 10668 (5'-CAG ACC ACG CTA CGG CG- 3') y 10770c (5'-CTA GGG CCG CGT GGG- 3'), 0.15 µL/ reacción de “Quanti Tect RT mix”, 7.50 µL/ reacción de “Master Mix” 2X y 2.25 pmol de la sonda 10691 (5'-TCT GCG GAG AGT GCA GTC TGC GAT- 3'). Un volumen de 1.5 µL de ARN se mezcló con 13.50 µL de la mezcla de reacción. Como control positivo se utilizó ARN de VON a una dilución 1:500, y como controles negativos agua libre de ARNasas y un control sin templado (NTC). El programa en el termociclador PTC-200 (MJ Research, Nevada, USA) consistió en un ciclo a 50° C por 30 minutos para la transcripción reversa y uno a 95° C por 15 minutos para inactivarla; la amplificación consistió en 45 ciclos a 95° C por 15 segundos para la desnaturalización y 60° C por 1 minuto para la hibridización y elongación. Finalmente, se incubó a 22° C indefinidamente.

El principio de ésta técnica (Figura 13) se basa en la detección de ADN por medio de fluorescencia. Después de la transcripción reversa (el paso de ARN a ADN), si se encuentra el fragmento de ADN de interés, la sonda se pega en una secuencia específica de este fragmento. La sonda está marcada en el extremo 5' con un fluoróforo (R en la Figura 13) y en el extremo 3' con una molécula secuestradora de fluorescencia (Q en la Figura 13), de tal manera que el fluoróforo no puede producir fluorescencia. A medida que se amplifica el fragmento de ADN la enzima polimerasa, gracias a su actividad 5' exonucleasa, corta la sonda y se libera el fluoróforo. Como resultado, aumenta la fluorescencia que puede ser detectada en tiempo real. Esto ocurre en cada ciclo de amplificación (Biosoft International, 2007).

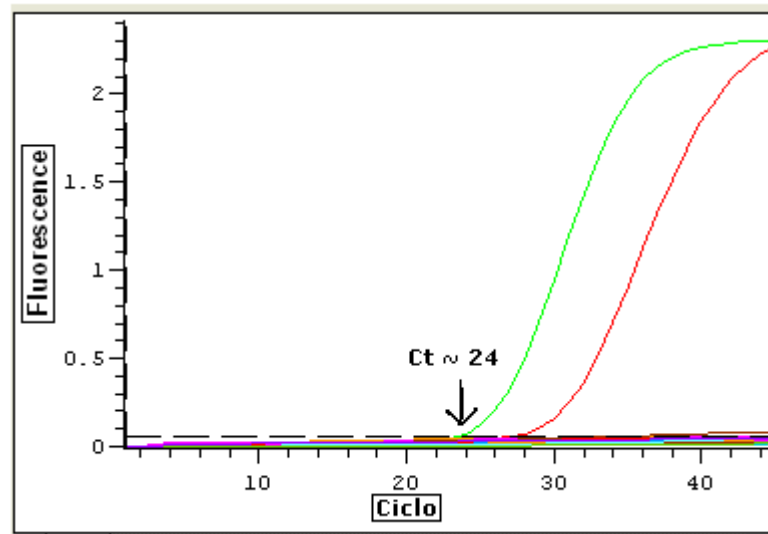
Figura 13. Principio de RT-PCR en Tiempo Real utilizando sondas específicas.



(Modificado de Biosoft International, 2007)

Se utilizó el Ct (ciclo en el cual la fluorescencia pasa la línea base de fluorescencia) para determinar si la muestra fue positiva o no. El parámetro para decidir el resultado fue: si $Ct < 38$ entonces la muestra es positiva, si $Ct > 39$ es negativa y si el Ct se encuentra entre 38 y 39 es un resultado dudoso. Un ejemplo de un resultado positivo se muestra en la Figura 14.

Figura 14. Representación de una muestra positiva utilizando RT-PCR en tiempo real con sondas específicas: en rojo y verde se presentan las gráficas obtenidas para los controles positivos (ARN de VON).



G. Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó por medio del programa SAS 9.1. Este análisis constó de dos partes. La primera parte del análisis tuvo como objetivo evaluar la abundancia de las poblaciones de *Culex quinquefasciatus*, y en la segunda parte se evaluó la presencia (tasa mínima de infección) de *Flavivirus* en los zancudos capturados.

En la primera parte se analizó la abundancia por medio de la densidad relativa de *Culex quinquefasciatus* en el estudio de foco de transmisión. Se expresó la densidad relativa como zancudos/trampa/noche. Se analizó si existen diferencias significativas entre la densidad relativa de los zancudos capturados en cada tipo de hábitat y tipo de trampa. Para ello se realizó una regresión de Poisson y se calculó el coeficiente de riesgo relativo (RR por sus siglas en inglés). El RR se define como la razón de la probabilidad de que ocurra un evento sobre otro ($RR = p_{\text{Evento1}} / p_{\text{Evento2}}$). De tal manera que si el $RR > 1$, existe una mayor probabilidad de que suceda el evento 1, y si $RR < 1$, existe una mayor probabilidad de que suceda el evento 2. Por otro lado, se evaluó la relación de la densidad relativa de *Culex quinquefasciatus* con la precipitación pluvial (datos obtenidos de INSIVUMEH, 2006), por medio de una correlación de Spearman.

En la segunda parte se analizó la presencia de *Flavivirus* por medio de la tasa mínima de infección (MIR por sus siglas en inglés). Ésta se calculó con la siguiente fórmula: $MIR = (\# \text{ de pools positivos} / \text{total de zancudos analizados}) * 1000$. Con los resultados obtenidos, se realizaron dos tipos de análisis: 1) Se evaluó la diferencia en la presencia de *Flavivirus* por tipo de trampa y tipo de hábitat. Lo anterior se realizó por medio de una prueba exacta de

Fisher para proporciones. 2) Se determinó la relación de la tasa mínima de infección relación con el mes y con la densidad relativa de *Culex quinquefasciatus*. Estos análisis se realizaron por medio de una correlación de Spearman.

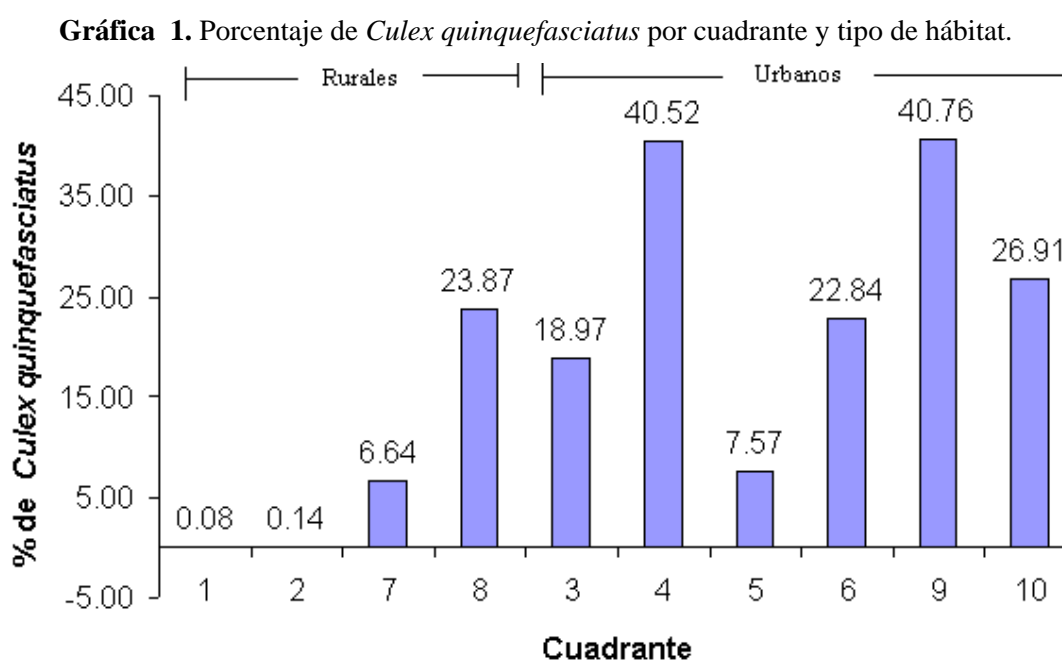
La significancia se evaluó a un nivel de $\alpha = 0.05$ para todos los casos, con un poder estadístico de 0.80 (valor estándar).

VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A. Análisis de la abundancia de *Culex quinquefasciatus* en el sitio de estudio

Con el fin de analizar la abundancia de *Culex quinquefasciatus*, inicialmente se determinó el porcentaje de zancudos por tipo de hábitat y la distribución de estos mismos por tipo de trampa y tipo de hábitat. Luego, se determinó la densidad relativa de *Culex quinquefasciatus* en el estudio de foco de transmisión. La densidad relativa se define como el número de zancudos capturados en una trampa y en una noche (zancudos/trampa/noche) en determinada localidad. Se realizaron análisis estadísticos para: 1) comparar la densidad relativa de *Culex quinquefasciatus* por tipo de hábitat (rural y urbano); 2) comparar la densidad relativa por tipo de trampa (CDC y grávida); y 3) analizar la correlación de la precipitación pluvial con la abundancia de *Culex quinquefasciatus*. Los dos primeros análisis se realizaron por medio de una regresión de Poisson, determinando el RR (coeficiente de riesgo); y el tercer análisis se realizó por medio de una correlación de Spearman (Ver Marco Metodológico, sección G).

1. Porcentaje de *Culex quinquefasciatus* por tipo de hábitat y su distribución por tipo de trampa y tipo de hábitat: Durante los 8 meses de estudio se capturaron un total de 1699 *Culex quinquefasciatus* en los 10 diferentes cuadrantes. En la Gráfica 1 se presenta el porcentaje de estos en relación con el total de zancudos capturados en cada cuadrante. En esta gráfica se observa que el porcentaje es mayor en la mayoría de los cuadrantes urbanos que en los rurales.

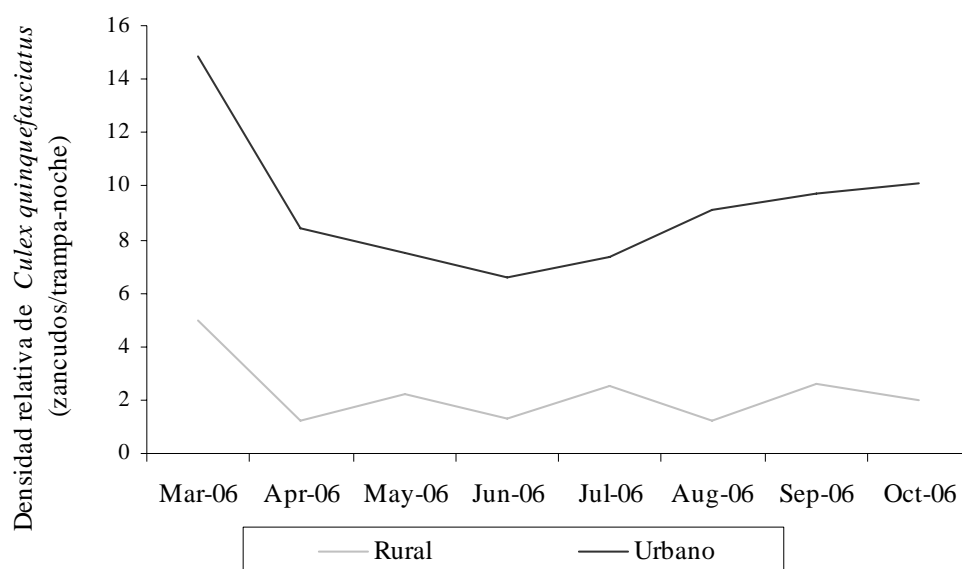


De los 1699 *Culex quinquefasciatus*, 558 fueron capturados en trampas CDC de luz y 1141 fueron capturados en trampas grávidas, 250 de estos zancudos fueron capturados en cuadrantes rurales y 1449 en cuadrantes urbanos.

2. Análisis de la abundancia de *Culex quinquefasciatus* por tipo de hábitat y tipo de trampa: Debido a que el hábitat de los vectores de enfermedades arbovirales juega un papel importante en la distribución de estas mismas, se comparó la densidad relativa en los dos tipos de hábitat (rural y urbano).

La densidad relativa de los zancudos capturados en los cuadrantes rurales (2.31 zancudos/trampa-noche) fue significativamente menor a la de los cuadrantes urbanos (9.54 zancudos/trampa-noche) (RR = -1.5907, p = 0.0003), independientemente del tipo de trampa y mes en que fueron capturados. Este resultado era esperado debido a que ha sido descrito anteriormente que *Culex quinquefasciatus* está asociado a sitios urbanos o sitios habitados por humanos (NSW, 1996). En la Gráfica 2 se muestra la densidad relativa de *Cx. quinquefasciatus*.

Gráfica 2. Abundancia de *Culex quinquefasciatus* según el tipo de cuadrante.

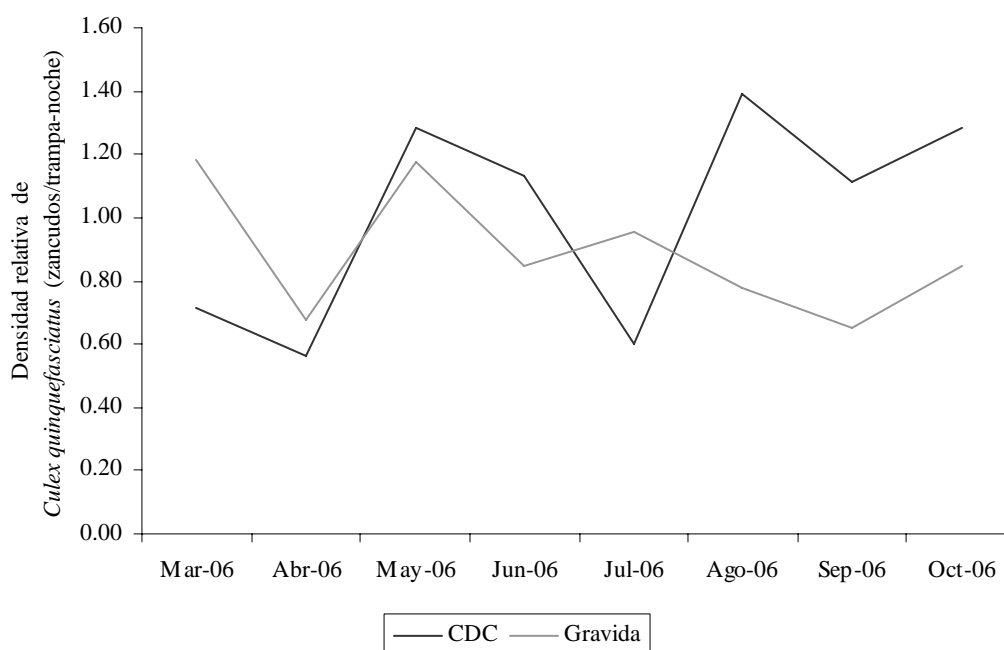


Luego de observar que existe una diferencia significativa en la densidad de *Culex quinquefasciatus* por tipo de hábitat, se procedió a determinar si existía alguna diferencia significativa por tipo de trampa (CDC y grávidas) en cada tipo de hábitat.

Se puede observar en la Gráfica 3 que en los cuadrantes urbanos, la densidad relativa en las trampas CDC fue menor que en las trampas grávidas en unos pocos meses (marzo, abril y julio). Esta diferencia fue significativa únicamente en el mes de marzo (RR = -2.2986, p =

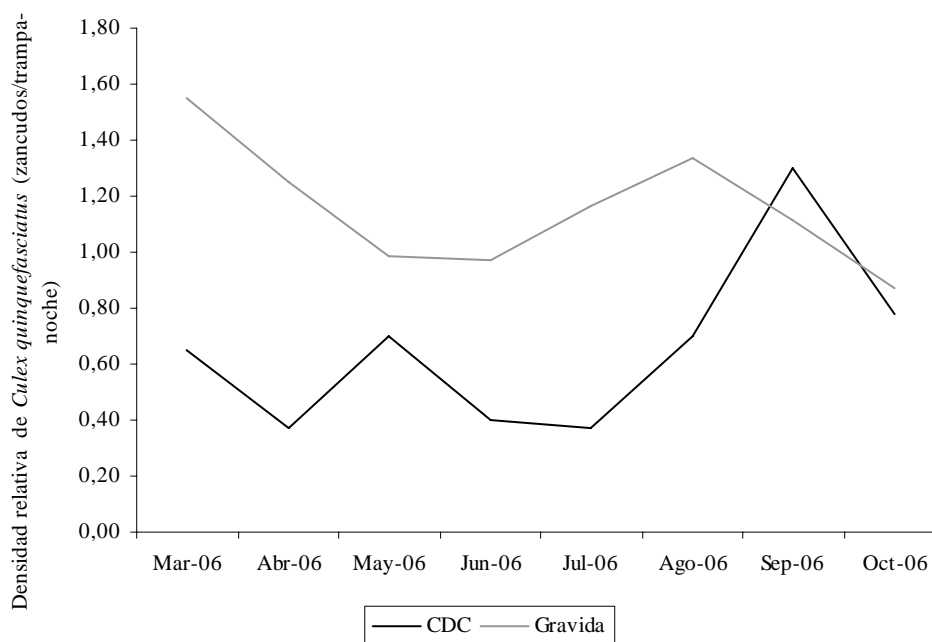
0.0046). En los meses restantes (mayo, junio, agosto, septiembre y octubre), la densidad de *Culex quinquefasciatus* tiende a ser mayor en las trampas CDC, aunque no significativamente (Ver Anexo D.1.c). En conjunto, las trampas grávidas tienden a capturar menos zancudos que las trampas CDC en los cuadrantes urbanos (RR = -0.6918), sin embargo esta diferencia no es significativa ($p = 0.1283$).

Gráfica 3. Abundancia de *Culex quinquefasciatus* según el tipo de trampa en los cuadrantes urbanos.



En la Gráfica 4 se puede observar que a diferencia de los cuadrantes urbanos, la densidad relativa de los cuadrantes rurales en las trampas CDC tiende a ser menor que en las trampas grávidas en casi la totalidad de los meses (marzo, abril, mayo, junio, julio, agosto y octubre). Esta diferencia fue significativa únicamente en marzo (RR = -1.8036, $p = 0.0257$). En septiembre, la densidad relativa de los zancudos capturados en las trampas grávidas tiende a ser mayor en las trampas CDC, aunque esta diferencia no es significativa (Ver Anexo D.1.d). Al comparar la densidad relativa de los zancudos en las trampas CDC y grávidas, tomando en cuenta todos los meses, se determinó que las trampas CDC capturan menos *Culex quinquefasciatus* (RR = -1.1757) en los cuadrantes rurales, de manera significativa ($p = 0.0230$).

Gráfica 4. Abundancia de *Culex quinquefasciatus* según el tipo de trampa en los cuadrantes rurales.



De forma complementaria, se comparó la densidad relativa de los zancudos capturados en las trampas CDC (4.22 zancudos/trampa-noche) versus las trampas grávidas (8.89 zancudos/trampa-noche). Esta comparación se realizó independientemente del hábitat y mes en que las trampas fueron colocadas. Se observó que la densidad relativa tiende a ser menor en las trampas CDC ($RR = -0.7267$), aunque esta diferencia no es significativa ($p = 0.0630$).

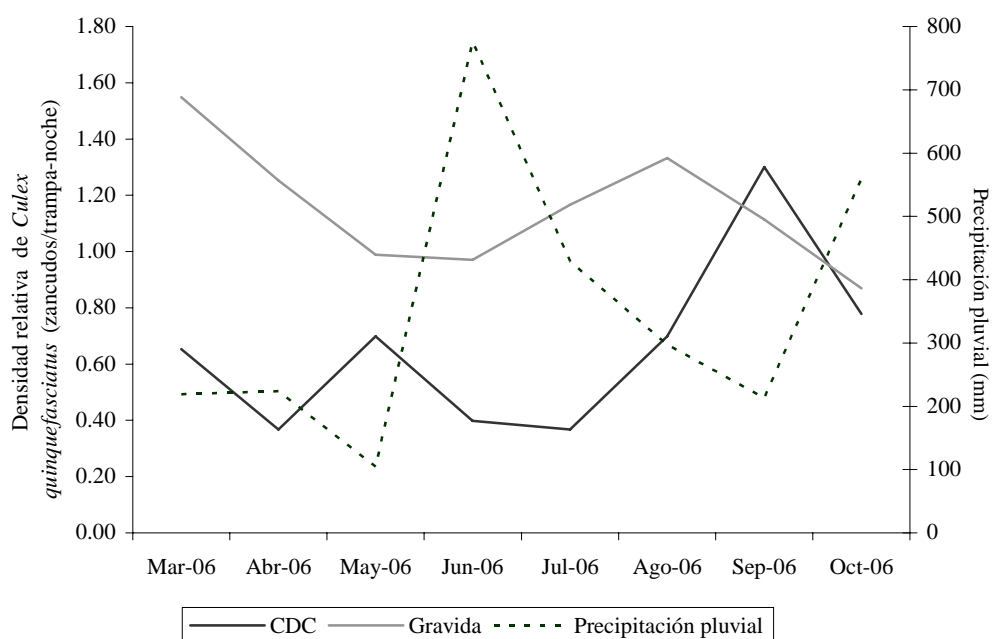
En los resultados anteriormente presentados, se observa que existe una tendencia a que en los cuadrantes rurales las trampas grávidas sean más exitosas para la captura de *Culex quinquefasciatus*, mientras que en los cuadrantes urbanos sean las trampas CDC.

En las trampas grávidas, se espera capturar zancudos que busquen donde ovipositar sus huevos, mientras que en las trampas CDC se espera capturar los que busquen principalmente alimentarse. De acuerdo a lo anterior, para las trampas grávidas, los resultados obtenidos pueden explicarse con el hecho de que en los cuadrantes urbanos probablemente existen una mayor cantidad de potenciales criaderos [aguas estancadas, drenajes, etc. (Weaver; Stein, 2002; Davis, 1929)], de tal manera que en estos cuadrantes, las trampas grávidas tienen una mayor competencia para la captura de *Culex quinquefasciatus*. Al contrario, en los cuadrantes rurales probablemente no existen muchos criaderos potenciales, por lo que la competencia por nicho en estos cuadrantes es menor. Es posible que en los cuadrantes urbanos funcionen mejor las trampas CDC debido a que si en estos se ha descrito que existe una mayor una mayor cantidad de potenciales criaderos, podría haber

una mayor proliferación y por lo tanto una mayor densidad de zancudos. De ser así, esto explicaría que las capturas en las trampas CDC de los cuadrantes urbanos tienden a ser mejores respecto a los rurales. Sin embargo, para confirmar estas hipótesis se requiere una mejor caracterización de los ambientes y de la biología de *Culex quinquefasciatus* en los sitios de estudio.

Por otro lado, al comparar la abundancia de los zancudos y la precipitación pluvial (como se muestra en forma de ejemplo en la Gráfica 5) se observa un pico de densidades en los meses de agosto y septiembre. Este pico de densidades concuerda con una disminución de la precipitación pluvial, justo después de su pico máximo. Esto podría explicarse por el hecho que después de los meses más lluviosos aumenta el número de potenciales criaderos para los zancudos, ya que se forman charcos, sitios con agua reposada, etc. Esto permite que los zancudos ovipositen más frecuentemente y por lo tanto que haya una mayor densidad. Al contrario, en el mes de julio (cuando hay un pico en la precipitación pluvial) se observa una disminución de la densidad. Esto podría ser debido a que en los meses más lluviosos, los criaderos de los zancudos son eliminados por el exceso de lluvia y los zancudos adultos permanecen refugiados la mayor parte del tiempo. En otros estudios se ha demostrado que en los mismos meses en que se observó el pico de densidades de *Culex quinquefasciatus* en este estudio, generalmente aumenta la transmisión de enfermedades transmitidas por zancudos (Elizondo-Quiroga, 2006 [b]).

Gráfica 5. Abundancia de *Culex quinquefasciatus* en áreas rurales y precipitación pluvial.



En complemento del análisis descriptivo anterior, se procedió a analizar si la precipitación pluvial podría explicar la variabilidad de la abundancia de *Culex quinquefasciatus* (ver sección siguiente).

En este tipo de estudio, se espera que los resultados obtenidos sean representativos de lo ocurrido en la naturaleza. Sin embargo, se debe tomar en cuenta que existen varios factores que podrían modificar en estos mismos. Entre estos factores se encuentran: el lugar en donde se colocan las trampas (i.e. a la intemperie, debajo de árboles, en lugares techados, cerca de cebos que representan competencia, etc.) y el esfuerzo de captura (# de trampas y # de noches). Por lo tanto, una vez obtenidos los resultados preliminares, es necesario afinar la metodología con el fin de minimizar el riesgo de que los resultados no sean representativos o estadísticamente significativos.

3. Análisis correlativo de la precipitación pluvial con la abundancia de

Culex quinquefasciatus: Para determinar si la precipitación pluvial explica la variabilidad de la abundancia de *Culex quinquefasciatus* en el foco de transmisión, se realizó una correlación de Spearman. Como se presenta a continuación, este análisis se realizó en cada tipo de hábitat por separado. Esto debido a que se encontró una diferencia significativa en la abundancia de *Culex quinquefasciatus* presentes en cada tipo de hábitat (ver sección A.2).

a. Correlación de la precipitación pluvial con la abundancia de *Culex quinquefasciatus* en cuadrantes urbanos: Se encontró que no existe correlación entre la precipitación pluvial y la abundancia de *Culex quinquefasciatus* en los cuadrantes urbanos ($p = 0.8020$). Sin embargo, existe una tendencia débil ($r_s = -0.06815$) a que la densidad de *Culex quinquefasciatus* disminuya con el aumento de la precipitación pluvial. Sin embargo, existen muchas otras variables que pueden inducir cambios en la abundancia de *Culex quinquefasciatus*. Entre éstas se encuentran: humedad relativa, días de lluvia consecutivos, viento, temperatura, presencia de hospederos, presencia de depredadores, y el tipo de hábitat (presencia o ausencia de árboles, potenciales criaderos, etc.).

b. Correlación de la precipitación pluvial con la abundancia de *Culex quinquefasciatus* en cuadrantes rurales: Al realizar la correlación de Spearman, se encontró que existe una tendencia negativa, no significativa, entre la precipitación pluvial y la abundancia de *Culex quinquefasciatus* ($r_s = -0.26074$, $p = 0.3294$).

Otras variables que pueden influir en la abundancia de *Culex quinquefasciatus* se discutieron en la sección anterior (A.3.a).

B. Detección de *Flavivirus* en *Culex quinquefasciatus* por métodos moleculares

La detección de *Flavivirus* en general y de VON específicamente en *Culex quinquefasciatus* se realizó por RT-PCR (convencional y en tiempo real, respectivamente como descrito en la metodología). Para la detección de *Flavivirus* se estandarizó un RT-PCR convencional (utilizando los iniciadores consensos: FU2 y cFD3), el cual se utilizó como primer tamizaje. Luego, se utilizó un RT-PCR con otro par de iniciadores (FU1 y cD2) como un segundo tamizaje. A continuación se presenta: 1) el RT-PCR estandarizado para la detección de *Flavivirus*, 2) la detección molecular de *Flavivirus* con el primer y segundo tamizaje; y 3) la detección del VON por RT-PCR en tiempo real.

1. Estandarización de RT-PCR para la detección de *Flavivirus*: Con el fin de estandarizar la detección molecular de *Flavivirus*, se probó 3 kits de RT-PCR con un par de iniciadores (FU2 y cFD3), como mencionado en el marco metodológico (sección F.1.a). Estos kits son: “QuantiTect SYBR Green RT-PCR” (Qiagen, Valencia, CA), RT-PCR en un solo paso “One Step RT-PCR” (Qiagen, Valencia, CA), y “SuperScript II RT” (Invitrogen, Carlsbad, CA), seguido de “Taq DNA polymerase” (Invitrogen, Carlsbad, CA). Para el primero se utilizó como base un protocolo de R.S. Lanciotti modificado por B.W. Johnson (2004). Para los dos restantes se utilizaron como base los protocolos sugeridos por el fabricante. En todos los casos se modificaron ciertas condiciones, principalmente la concentración de los iniciadores y la temperatura de hibridización, según lo requerido.

Como controles positivos, se utilizó ARN de los siguientes *Flavivirus*: ARN del VON (en diluciones 1:100, 1:200, 1:400, 1:600 y 1:800) y ARN de virus de Dengue (en una dilución 1:200). Para asegurarse que por este método se amplifican diferentes *Flavivirus*, lo ideal hubiera sido utilizar como controles positivos, ARN de al menos otros 4 *Flavivirus*. Sin embargo, esto no fue posible por no contar con ARN viral de estos mismos.

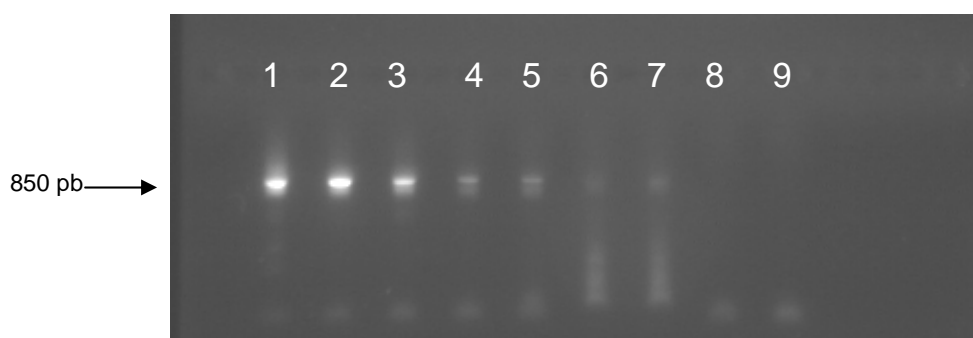
En base a los resultados iniciales (no mostrados), se decidió utilizar el Kit “QuantiTect SYBR Green RT-PCR”, y aunque está especialmente diseñado para RT-PCR en tiempo real, los resultados se analizaron por medio de un gel de agarosa 2 % teñido con bromuro de etidio después de la amplificación.

Se escogió este kit ya que este fue el único que permitió detectar la amplificación del genoma viral a partir de los controles positivos utilizados con los iniciadores consensos para *Flavivirus* que se escogieron (FU2 y cFD3). En cuanto a la especificidad, los cebadores seleccionados permitieron la amplificación de un fragmento suficientemente grande (850 pb) para poder distinguirlo de los dímeros de iniciadores. Por otro lado, de los tres kits probados este es el más económico.

La mezcla de reacción que se encontró mas adecuada para la amplificación del genoma viral fue 25 pmol de los iniciadores FU2 (5'-GCT GAT GAC ACC GCC GGC TGG GAC AC- 3') y cFD3 (5'-AGC ATG TCT TCC GTG GTC ATC CA- 3'), 0.25 µL/ reacción de "Quanti Tect RT mix", 12.5 µL/ reacción de "Master Mix" 2X. Un volumen de 5 µL del ARN extraído se mezcló con 20 µL de la mezcla de reacción. El programa en el termociclador PTC-200 (MJ Research, Nevada, USA) consistió en un ciclo a 50° C por 30 minutos para la transcripción reversa y uno a 95° C por 15 minutos para inactivarla; la amplificación consistió en 45 ciclos a 94° C por 15 segundos para la desnaturalización, 60° C por 30 segundos para la hibridización, y 72° C por 30 segundos para la elongación. Finalmente, se incubó a 22° C indefinidamente.

En la Figura 15 se encuentra un gel únicamente con las diluciones de ARN viral anteriormente mencionadas como controles positivos y agua como control negativo.

Figura 15. Estandarización de RT-PCR para la detección de *Flavivirus*.



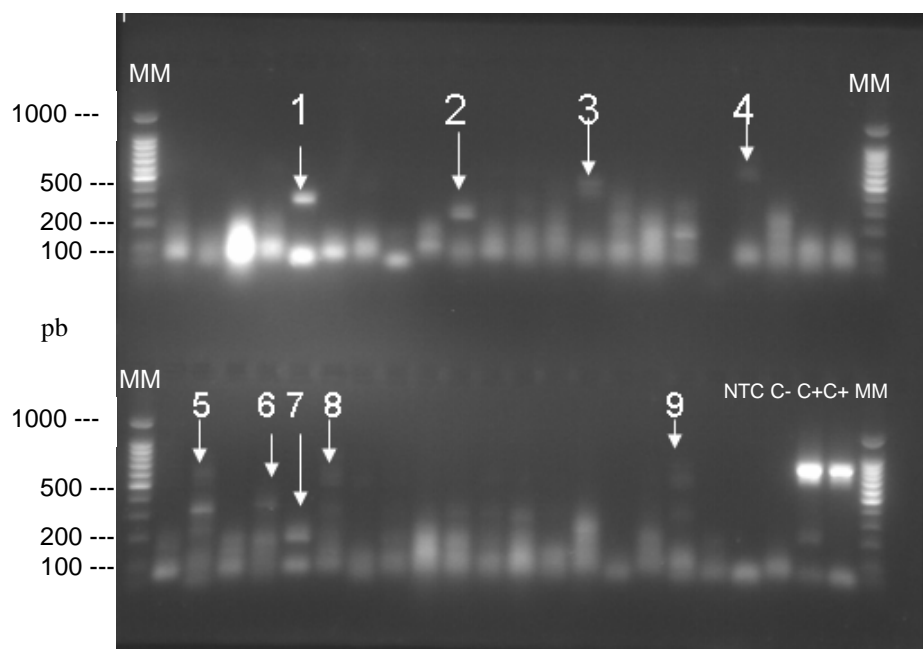
Gel de agarosa 2 % teñido con bromuro de etidio. Pozos: 1. Control positivo VON 1:100. 2. Control positivo VON 1:200. 3. Control positivo VON 1:400. 4. Control positivo VON 1:600. 5. Control positivo VON 1:800. 6. Control positivo Dengue 1:200. 7. Control positivo Dengue 1:200. 8. Control negativo sin templado (NTC). 9. Control negativo con agua.

2. Detección molecular de *Flavivirus*: Para identificar la presencia de *Flavivirus* en los pools de *Culex quinquefasciatus*, se procedió a realizar un primer tamizaje. Este consistió en la amplificación de ARN de *Flavivirus* por RT-PCR según la técnica estandarizada descrita en la sección anterior (B.1), como mencionado con anterioridad. Posteriormente, se escogieron los positivos según el primer tamizaje y estos fueron sometidos a una amplificación con otro par de iniciadores. Estos iniciadores, FU1 (5' – TAC AAC ATG ATG GGA AAG AGA GAG AA – 3') y cFD2 (5' – GTG TCC CAG CCG GCG GTG TCA TCA GC – 3'), amplifican un fragmento de 250 bp. Los productos de amplificación se analizaron en un gel de agarosa 2% teñido con bromuro de etidio. Para este análisis, se utilizó como control positivo únicamente ARN del VON en dilución 1:100.

Un pool de *Culex quinquefasciatus* fue considerado “positivo” si se obtenía amplificación a partir de este mismo con los dos pares de iniciadores para *Flavivirus*. La tasa mínima de infección de *Culex quinquefasciatus* con *Flavivirus* se calculó utilizando los datos de pools positivos según este criterio. Sin embargo, los resultados de RT-PCR aún deben confirmarse, por lo que los cálculos son susceptibles a modificaciones. Para la confirmación de estos resultados, los pools de zancudos fueron enviados al laboratorio de la Dra. B. Johnson de los Centros para el control y prevención de enfermedades (CDC) de Fort Collins, CO, USA.

En la siguiente Figura se observa un ejemplo de un gel con pools positivos utilizando los iniciadores FU2 y cFD3 (primer tamizaje). Otros gels con pools positivos se presentan en el anexo C.

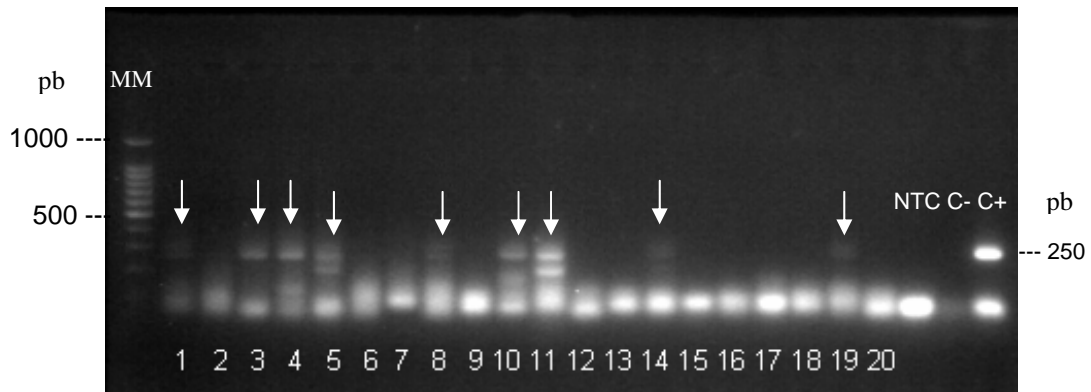
Figura 16. Tamizaje inicial por RT-PCR para la detección de *Flavivirus*.



Se presenta la foto de uno de los gels analizados (Gel de agarosa 2 %, tinción con bromuro de etidio) con productos de amplificación de pools de *Culex quinquefasciatus* con los iniciadores FU2 y cFD3. MM: Marcador molecular 100 pb. Se indica con números del 1 – 9, los pools de *Culex quinquefasciatus* positivos o dudosos. NTC: Control negativo sin templado. C-: Control negativo con agua. C+: Control positivo 1:100.

Inicialmente, se obtuvo 20 pools que presentaron bandas de tamaño variable con los iniciadores FU2 y cFD3. De estos 20 pools, 9 fueron positivos con los iniciadores FU1 y cFD2, como se muestra en la Figura 17.

Figura 17. Confirmación de pools positivos para *Flavivirus* por RT-PCR con primers FU1/cFD2 (segundo tamizaje).



Gel de agarosa 2 % teñido con bromuro de etidio. MM: Marcador molecular de 100 pb. Se indica con números del 1 – 20, los pools de *Culex quinquefasciatus* posibles positivos con el primer tamizaje. Se indican con flechas los identificados finalmente como positivos. NTC: Control negativo sin templado. C-: Control negativo con agua. C+: Control positivo 1:100.

En la Figura anterior, se observa que se amplificaron bandas de diferente intensidad a partir de los 9 pools identificados como positivos. Esto probablemente se debe a diferencias en la carga viral de los zancudos, o a la cantidad de zancudos infectados en cada pool. Se observa también que además del fragmento deseado (250 pb), se amplificaron bandas de ~200 pb a partir algunos de estos pools. Esto puede deberse a productos de amplificación inespecíficos y contaminantes. Por lo tanto, es necesario confirmar estos resultados. Como ya se mencionó anteriormente, estos pools fueron enviados al laboratorio del CDC de Fort Collins para confirmar que son positivos.

Finalmente, los 9 pools identificados como positivos se utilizaron para realizar los análisis de la tasa mínima de infección (ver sección C.1 y C.2). De estos 9 pools, 3 fueron de zancudos capturados en trampas CDC y 6 en trampas grávidas. Además, únicamente 1 de estos fue de zancudos capturados en hábitat rural, y los 8 restantes en hábitat urbano. También se observó que la mayoría de estos pools fueron de zancudos capturados en los últimos meses de estudio. La información anterior se encuentra en el Cuadro 2.

Cuadro 2. Información del mes de colecta, tipo de trampa y cuadrante en que fueron capturados los zancudos de los pools positivos.

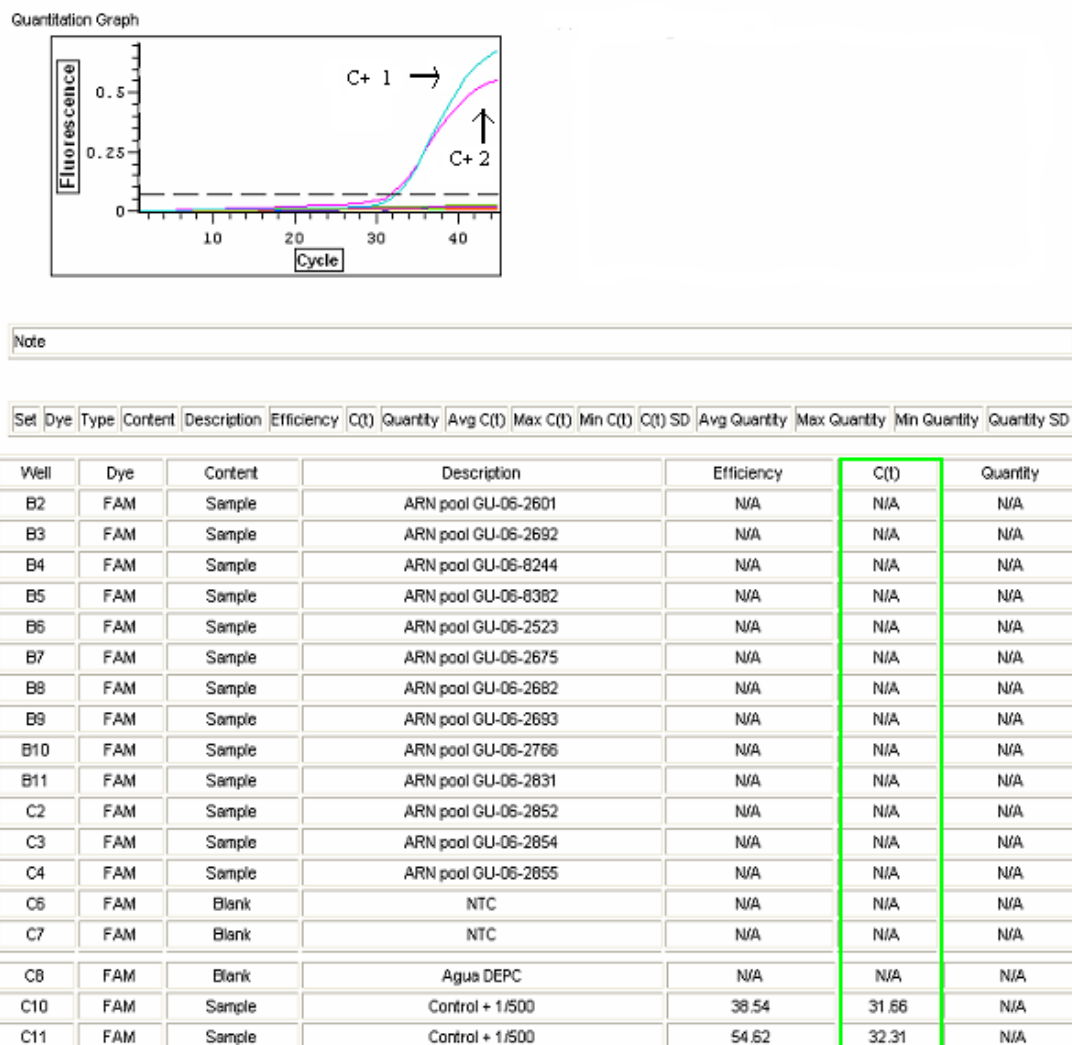
Numero de pool	Mes de colecta	Tipo de trampa	Tipo de hábitat
GU-2006-00951	Marzo	Grávida	Urbano
GU-2006-01243	Abril	Grávida	Urbano
GU-2006-02692	Agosto	CDC	Urbano
GU-2006-02810	Agosto	Grávida	Urbano
GU-2006-02898	Septiembre	Grávida	Rural
GU-2006-02933	Septiembre	CDC	Urbano
GU-2006-02946	Septiembre	Grávida	Urbano
GU-2006-08391	Octubre	Grávida	Urbano
GU-2006-08395	Octubre	CDC	Urbano

3. **Detección molecular del VON:** Como ya se mencionó, la detección del VON se realizó por medio de RT-PCR en tiempo real utilizando una sonda específica por el método de Taqman (ver sección F.2 de Metodología). Se utilizó como control ARN del VON en dilución 1:500.

El criterio para considerar una muestra positiva fue: Ct (ciclo en el cual la fluorescencia pasa la línea base) < 38. De los 210 pools de *Culex quinquefasciatus* probados, ninguno fue positivo para VON. En la Figura 18, se puede observar un ejemplo de estos resultados.

A pesar de la alta sensibilidad y especificidad de la técnica molecular utilizada y de que existe evidencia serológica de la transmisión viral en el municipio de Puerto Barrios (ver sección F de Antecedentes), no se logró detectar por Taqman ningún pool de zancudos positivo para VON. Existen varias posibles explicaciones: 1) la probabilidad de capturar zancudos infectados es baja, a pesar de la relativa abundancia de *Culex quinquefasciatus* en la zona de estudio; es probable que se necesite un mayor esfuerzo de captura para encontrar un zancudo infectado; 2) puede ser que *Culex quinquefasciatus* no sea el responsable de la transmisión del VON a las aves de Puerto Barrios; 3) la cepa local del VON no es detectada por la sonda utilizada en el experimento. En efecto, la sonda TaqMan utilizada en estos experimentos fue diseñada para detectar una región altamente conservada del genoma viral en base a la cepa del VON NY99, aislada en Nueva York en 1999. Aunque es poco probable por tratarse de una región del genoma viral altamente conservada, no se puede excluir la posibilidad de que la cepa local no sea detectada por esta técnica.

Figura 18. Detección del VON a partir de pools de *Culex quinquefasciatus* por RT-PCR en tiempo real.



Ejemplo con muestras negativas para VON. Las líneas de fluorescencia que se indican con flechas en la gráfica corresponden a controles positivos (C+1 y C+2). La columna resaltada en verde corresponde al Ct (ciclo en el cual la fluorescencia pasa la línea base) de las muestras y los controles. N/A: no amplificación; Ct C+1: 31.56; Ct C+2: 32.31; NTC: control negativo sin templado.

C. Análisis comparativo y correlativo de la tasa mínima de infección con *Flavivirus*

Tal como descrito en la metodología, la infección de *Culex quinquefasciatus* con *Flavivirus*, se analizó por medio de la tasa mínima de infección. Esta se define como el # de pools positivos/total de zancudos analizados*1000. De esta manera, se está suponiendo que en cada pool positivo existe al menos un zancudo positivo.

A partir de los resultados obtenidos, se realizaron dos tipos de análisis: 1) Un análisis comparativo de la tasa mínima de infección; y 2) Un análisis correlativo de la tasa mínima de infección con el mes de captura y con la abundancia de los *Culex quinquefasciatus* capturados. Estos análisis se presentan en las secciones siguientes.

1. Comparación de la tasa mínima de infección con *Flavivirus* por tipo de trampa: Dado que los valores obtenidos son muy cercanos a cero, esta comparación se realizó por medio de una prueba exacta de Fisher. Como se mencionó en la sección B.2, 6 de los pools positivos fueron de zancudos capturados en trampas grávidas y 3 fueron de zancudos capturados en trampas CDC. En el Cuadro 3 se presenta un resumen del número de pools positivos por tipo de trampa y mes, y su respectiva tasa mínima de infección.

Cuadro 3. Número de pools de zancudos positivos por tipo de trampa y su respectiva tasa mínima de infección.

Mes de colecta	Trampas CDC		Trampas grávidas	
	# de pools positivos/ 558 total zancudos	MIR*	# de pools positivos/ 1141 total zancudos	MIR*
Marzo	0	0	1	0.876
Abril	0	0	1	0.876
Mayo	0	0	0	0
Junio	0	0	0	0
Julio	0	0	0	0
Agosto	1	1.792	1	0.876
Septiembre	1	1.792	2	1.753
Octubre	1	1.792	1	0.876

*Tasa mínima de infección.

Al realizar la prueba exacta de Fisher, se encontró que no existe diferencia significativa ($p = 1.00$) en la tasa de infección con *Flavivirus* según el tipo de trampa utilizada para la captura de *Culex quinquefasciatus*. Lo anterior, independientemente del mes de captura. De manera complementaria, se realizó el mismo análisis en cada mes. No se encontró diferencia significativa en ninguno de estos ($p = 0.5941$ en agosto y octubre, y $p = 1.00$ en los meses restantes).

En cada trampa utilizada, se espera capturar zancudos en diferentes etapas de su ciclo de vida y de alimentación. Generalmente, los zancudos capturados en las trampas CDC buscan alimentarse y los zancudos capturados en las trampas grávidas buscan ovipositar. En

efecto, se encontró que existe diferencia significativa al comparar el número de hembras grávidas y no alimentadas capturadas en cada tipo de trampa (Chi^2 – datos no mostrados). Las trampas CDC capturan más hembras no alimentadas y las trampas grávidas capturas más hembras grávidas de manera significativa ($p < 0.0001$ y $p = 0.0002$, respectivamente). Por otro lado, se sabe las hembras ovipositan sus huevos 3 noches después de haberse alimentado. Por lo tanto, los zancudos capturados en las trampas grávidas, tienen una mayor probabilidad de que se hayan alimentado al menos una vez después de emerger como adulto. Esto hace que la probabilidad de que estén infectados aumente, si se trata de un arbovirus transmitido por zancudos. Por estas razones, se esperaba que la tasa mínima de infección en los zancudos capturados en trampas grávidas fuera significativamente mayor que las trampas CDC. Sin embargo, como ya se mencionó, no se encontró diferencia significativa, talvez debido a que se detectó relativamente pocos pools positivos. Probablemente, se necesita aumentar el esfuerzo de captura para encontrar una diferencia significativa.

Por otro lado, existen un grupo de *Flavivirus* que circulan exclusivamente en insectos, que no transmiten el virus a un hospedero susceptible. Estos virus son transmitidos de un insecto a otro transováricamente, de tal manera que la probabilidad de encontrar un zancudo infectado no depende del número de ingestas. En caso de que el virus encontrado sea un *Flavivirus* de insectos, esto podría explicar el no haber encontrado diferencia significativa en la tasa mínima de infección de cada tipo de trampa.

2. Comparación de la tasa mínima de infección con *Flavivirus* por tipo de hábitat: Al igual que el análisis por tipo de trampa, este análisis se realizó por una prueba exacta de Fisher. Como mencionado en la sección B.2, de los 9 pools positivos, 8 fueron obtenidos en cuadrantes con hábitat urbano y únicamente 1 fue obtenido en un cuadrante con hábitat rural. A continuación se presenta un resumen de los pools positivos por tipo de hábitat y mes, y su respectiva tasa mínima de infección (Cuadro 4).

Por medio de la prueba exacta de Fisher, se encontró que no existe diferencia significativa en la tasa de infección con *Flavivirus* en los zancudos capturados en cada tipo de hábitat ($p = 1.00$). Al realizar este análisis en cada mes, no se encontró diferencia significativa en ninguno de estos mismos ($p = 0.3799$ en septiembre y $p = 1.00$ en los meses restantes).

Aunque la diferencia en el número de pools positivos detectados en ambos tipos de hábitat es relativamente grande (1:8 en rural:urbano), esta diferencia no es significativa según el test realizado. Es probable que se necesite analizar un mayor número de muestras para encontrar una diferencia significativa. Otra posible explicación es que se haya obtenido

menos pools positivos del área rural simplemente por que los *Cx. quinquefasciatus* son menos abundantes en los sitios rurales.

Cuadro 4. Número de pools de zancudos positivos por tipo de hábitat y su respectiva tasa mínima de infección.

Mes de colecta	Hábitat rural		Hábitat urbano	
	# de pools positivos/ 250 total zancudos	MIR*	# de pools positivos/ 1449 total zancudos	MIR*
Marzo	0	0	1	0.690
Abril	0	0	1	0.690
Mayo	0	0	0	0
Junio	0	0	0	0
Julio	0	0	0	0
Agosto	0	0	2	1.380
Septiembre	1	4	2	1.380
Octubre	0	0	2	1.380

*Tasa mínima de infección.

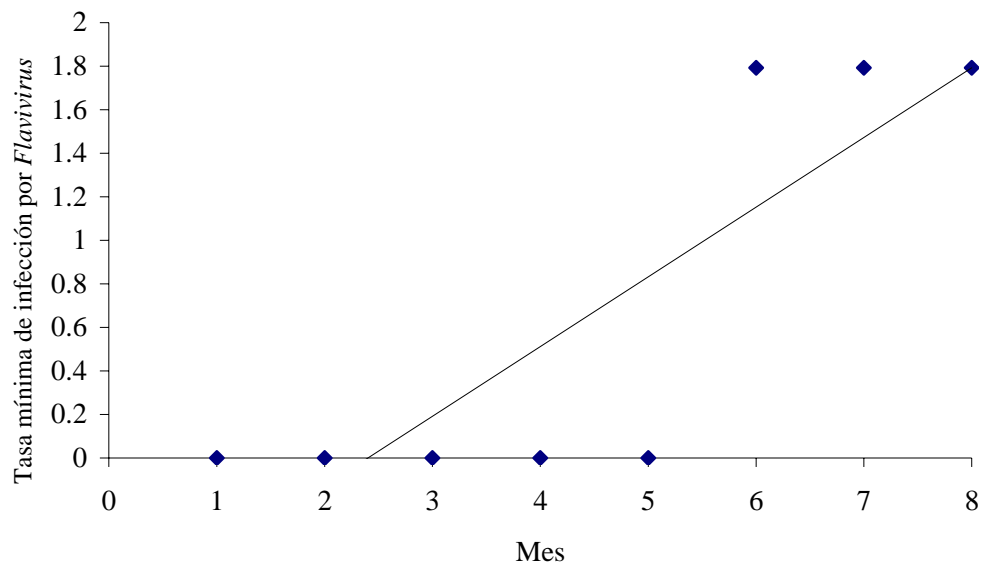
3. Correlación del mes de captura con la tasa mínima de infección con *Flavivirus*: Este análisis se realizó por tipo de trampa y tipo de hábitat utilizando correlación de Spearman, con el fin de complementar los análisis presentados en las secciones C.1 y C.2.

Se determinó que la infección con *Flavivirus* aumenta significativamente con el mes de captura en las trampas CDC ($r_s = 0.84515$, $p = 0.0082$), lo que se puede observar claramente en la Gráfica 6. Se encontró también que no existe correlación del mes de captura con la tasa mínima de infección con *Flavivirus* en zancudos capturados en sitios urbanos, en sitios rurales, y en trampas grávidas ($p = 0.1428$, $p = 0.3100$, $p = 0.4704$, respectivamente). Sin embargo, como se observa en las Gráficas 7, 8 y 9, existe una tendencia a que la infección aumente en los últimos meses de estudio ($r_s = 0.29994$, $r_s = 0.56695$, $r_s = 0.41239$, en trampas grávidas, en sitios urbanos y rurales, respectivamente). Lo anterior concuerda con lo observado en los Cuadros 3 y 4. Estos resultados podrían sugerir que la circulación de los *Flavivirus* tiene cierta estacionalidad. Para comprobar esta hipótesis es necesario extender el estudio en el tiempo.

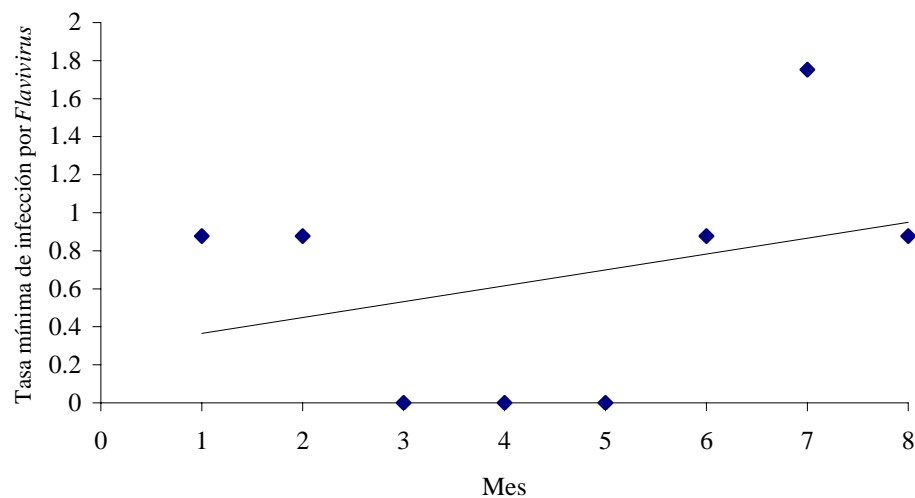
Finalmente, los resultados obtenidos también sugieren que la variable ‘mes’ influye de manera significativa en un 84% (para las trampas CDC) en el # de infecciones por *Flavivirus* en *Culex quinquefasciatus*. Dentro de los factores que podrían explicar esta

variabilidad, se encuentran factores bióticos y abióticos que varían de mes a mes. Entre estos factores se encuentran la precipitación pluvial, temperatura, humedad relativa, viento, variabilidad de hospederos, abundancia de los zancudos, etc. La infección de *Culex quinquefasciatus* por *Flavivirus* también podría ser influenciada también por otras variables que probablemente no cambian con el mes, tal como la infección transovárica.

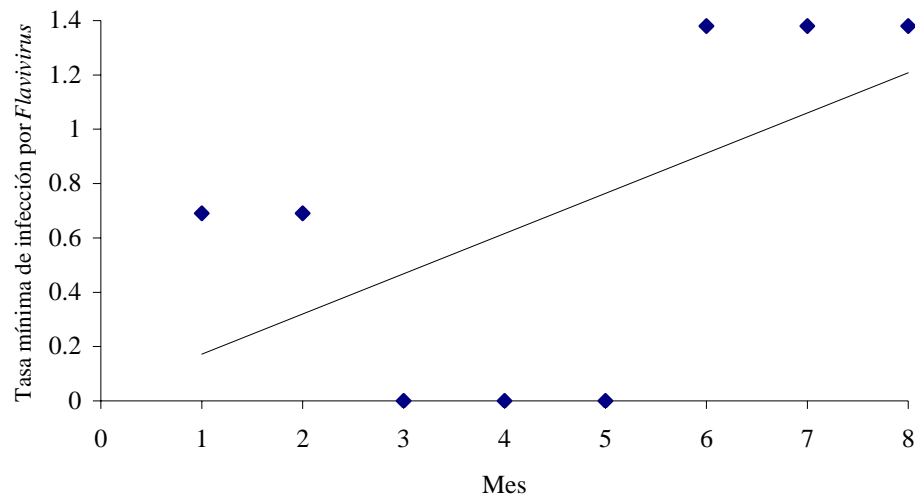
Gráfica 6. Correlación del mes de captura con la tasa mínima de infección con *Flavivirus* en trampas CDC.



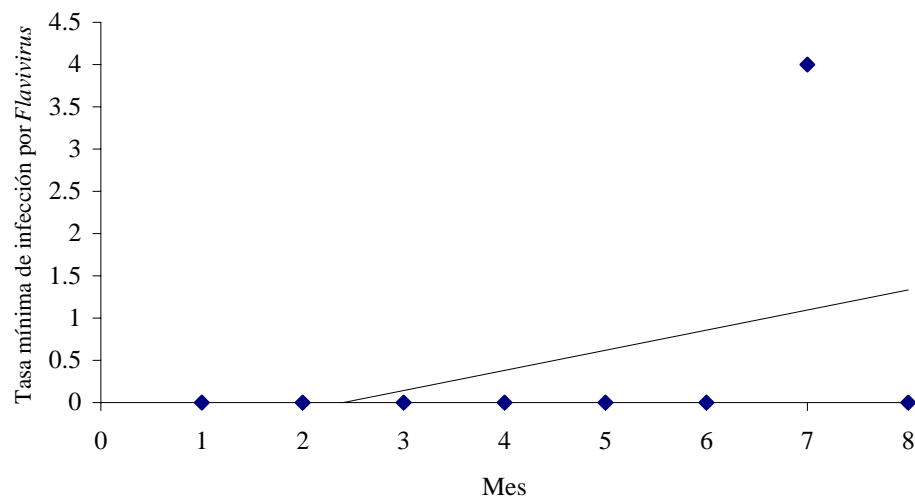
Gráfica 7. Correlación del mes de captura con la tasa mínima de infección con *Flavivirus* en trampas grávidas.



Gráfica 8. Correlación del mes de captura con la tasa mínima de infección con *Flavivirus* en cuadrantes urbanos.



Gráfica 9. Correlación del mes de captura con la tasa mínima de infección con *Flavivirus* en cuadrantes rurales.

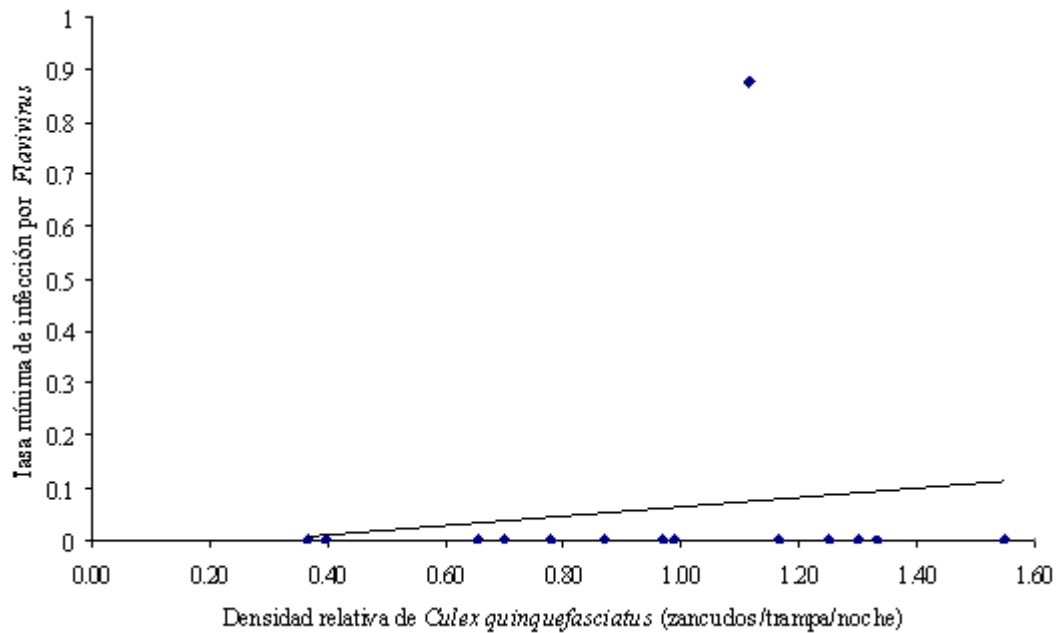


4. Correlación de la abundancia de *Culex quinquefasciatus* con la tasa mínima de infección con *Flavivirus*: Este análisis se realizó por correlación de Spearman, separando el tipo de hábitat. Esto debido a que se encontró una diferencia significativa en las densidades relativas de *Culex quinquefasciatus* capturados en los dos tipos de hábitat.

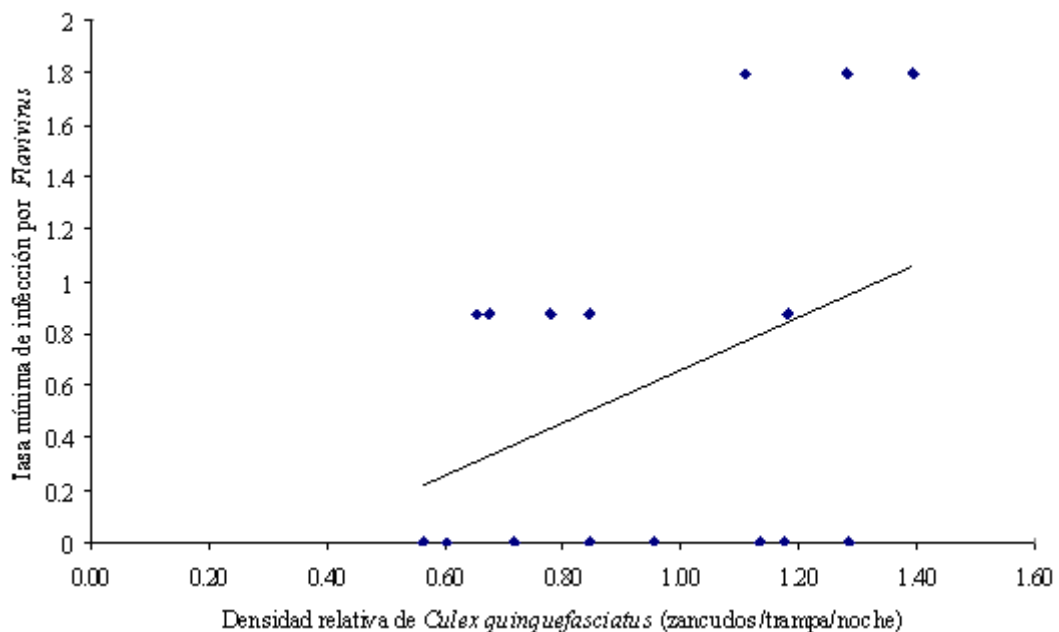
De manera general, no se encontró ninguna correlación entre la densidad relativa de *Culex quinquefasciatus* y la tasa mínima de infección ($p = 0.6045$, $p = 0.2748$, en cuadrantes rurales y urbanos, respectivamente). Sin embargo, como se observa en las Gráficas 10 y 11,

existe una tendencia a que la tasa mínima de infección aumente con la densidad de *Culex quinquefasciatus*. Esta tendencia es mayor en los cuadrantes urbanos ($r_s = 0.29055$) que en los rurales. ($r_s = 0.14023$).

Gráfica 10. Correlación de la densidad relativa de *Culex quinquefasciatus* con la tasa mínima de infección con *Flavivirus* en cuadrantes rurales



Gráfica 11. Correlación de la densidad relativa de *Culex quinquefasciatus* con la tasa mínima de infección con *Flavivirus* en cuadrantes urbanos.



De manera general, el objetivo de esta investigación fue estudiar factores claves para comprender la biología de *Flavivirus* transmitidos por vectores, en particular de zancudos de la especie *Culex quinquefasciatus*. Para implicar a una determinada especie de zancudo como vector de un determinado *Flavivirus*, existen varios criterios: 1) demostrar la presencia del arbovirus en una especie determinada de zancudos capturados en el campo; 2) demostrar que la especie de zancudo en cuestión es un vector competente en laboratorio para el virus cuando se alimenta de sangre infectada (es capaz de infectarse y transmitir el virus); 3) el zancudo se debe alimentar del posible hospedero amplificador en la naturaleza; y 4) demostrar que las densidades relativas de la especie en el campo son suficientes para permitir la transmisión del virus. Este último criterio puede variar según la especie de zancudo y el arbovirus transmitido por esta misma, algunos zancudos poco abundantes pueden ser vectores muy eficientes de ciertos arbovirus como por ej. *Aedes aegypti* y Dengue (H. Savage, comunicación personal).

Los resultados de este estudio sugieren que *Culex quinquefasciatus* podría ser vector de algunos *Flavivirus* en el municipio de Puerto Barrios. Varios resultados apoyan esta idea como la abundancia de *Culex quinquefasciatus* respecto a otras especies en el foco de transmisión. Se observó un aumento en la densidad de *Culex quinquefasciatus* en los meses de agosto y septiembre, meses en los cuales se detectó varios pools positivos para *Flavivirus*. Aunque no se obtuvo ningún pool positivo para VON en estos meses, en la misma época del año se detectó actividad de este virus en gallinas. En conjunto, se puede decir que aunque no se demuestra que *Culex quinquefasciatus* es un posible vector de VON, sí se observa que el aumento de esta especie coincide con el aumento de la actividad de *Flavivirus* en el foco de transmisión. No obstante, para involucrar a *Culex quinquefasciatus* como vector de *Flavivirus*, es necesario confirmar los resultados, y llevar a cabo estudios complementarios. Por ejemplo, determinar la preferencia de alimentación del zancudo, su competencia vectorial y caracterizar al o los *Flavivirus* detectados. En efecto, esta familia de virus incluye numerosos arbovirus entre los cuales se encuentran algunos que son exclusivos de insectos y no tienen hospederos vertebrados conocidos. También se debe estudiar la biología de *Culex quinquefasciatus* en los sitios de estudio y determinar la tasa de sobrevivencia de esta especie para definir su importancia en el ciclo de transmisión de *Flavivirus*.

En general, los resultados obtenidos proveen herramientas para definir mejor la biología de los *Flavivirus*, potencialmente dañinos para la salud humana y animal. Es importante realizar este tipo de estudios con el fin de identificar los posibles blancos de intervención en caso de brotes debidos a *Flavivirus* transmitidos por vectores. Por ejemplo, si se identifica a *Culex quinquefasciatus* como vector de determinado *Flavivirus*, se pueden dirigir estrategias específicas de control vectorial.

VIII. CONCLUSIONES

- A. La densidad relativa de los zancudos de la especie *Culex quinquefasciatus* capturados en los cuadrantes rurales fue significativamente menor a la de los cuadrantes urbanos.
- B. No existe diferencia significativa en la eficiencia de ambos tipos de trampas para capturar *Culex quinquefasciatus*.
- C. No existe correlación entre la precipitación pluvial y la abundancia de *Culex quinquefasciatus* en ninguno de los dos tipos de hábitat.
- D. Se encontraron 9 muestras positivas para *Flavivirus*. De estas, 3 fueron pools de zancudos capturados en trampas CDC y 6 en trampas grávidas; 1 pool fue obtenido en hábitat rural y 8 en hábitat urbano.
- E. No se encontró ningún pool positivo para VON, posiblemente por: 1) la probabilidad de capturar zancudos infectados es baja, es probable que se necesite un mayor esfuerzo de captura para encontrar un zancudo infectado; 2) *Culex quinquefasciatus* no sea el responsable de la transmisión del VON en Puerto Barrios; 3) Aunque es poco probable, el VON que circula en Puerto Barrios podría ser diferente al virus detectado por la sonda TaqMan. No se puede excluir la posibilidad que el virus local tenga una secuencia genómica diferente que no se detecte por esta técnica.
- F. No existe diferencia significativa en la infección con *Flavivirus* en los *Culex quinquefasciatus* capturados en cada tipo de hábitat y en cada tipo de trampa.
- G. La correlación de la tasa mínima de infección con *Flavivirus* y la abundancia de *Culex quinquefasciatus* sugiere que la transmisión de *Flavivirus* por *Culex quinquefasciatus* en Puerto Barrios podría tener cierta estacionalidad.
- H. Los resultados obtenidos proveen herramientas para definir mejor la biología de los *Flavivirus* que circulan en *Cx. quinquefasciatus* de Puerto Barrios.
- I. En caso de identificar a *Culex quinquefasciatus* como vector de algún *Flavivirus* potencialmente peligroso para la salud humana o animal, se pueden implementar estrategias específicas de control vectorial.

IX. RECOMENDACIONES

- A. Para minimizar el riesgo de que los resultados no sean representativos de lo que sucede en la naturaleza o estadísticamente representativos, es necesario tomar en cuenta en el diseño experimental y análisis, factores que podrían influenciar el éxito de captura, por ej. el lugar donde se colocan las trampas.
- B. Utilizar ARN de diversos *Flavivirus* (de ser posible endémicos y no endémicos de la localidad geográfica de estudio) como controles positivos para asegurarse de que la técnica estandarizada amplifica diferentes *Flavivirus*.
- C. Aumentar el esfuerzo de captura para obtener suficientes zancudos positivos y reducir así posibles sesgos al calcular la tasa mínima de infección con *Flavivirus*.
- D. Para comprobar que la circulación de los *Flavivirus* tiene cierta estacionalidad es necesario extender el estudio en el tiempo.
- E. Caracterizar la biología de *Culex quinquefasciatus* (ej. tasa de sobrevivencia, criaderos potenciales, etc.) para definir su importancia en el ciclo de transmisión de *Flavivirus*.
- F. Es necesario identificar los *Flavivirus* encontrados en *Culex quinquefasciatus*.
- G. Finalmente se recomienda realizar estudios complementarios, como la preferencia de alimentación sanguínea del zancudo y su competencia vectorial en laboratorio.

X. LITERATURA CITADA

1. Alameda Country Mosquito Abatement. 2007. *Biological Notes on Mosquitoes*. Disponible en: <http://www.mosquitoes.org/LifeCycle.html>
2. Allan, S. y D. Kline. 2004. *Evaluation of various attributes of gravid female traps for collection of Culex in Florida*. Journal of Vector Ecology 29(2):285-294.
3. AMCA. 2005. *West Nile Virus*. Disponible en: <http://www.mosquito.org/mosquito-information/virus.aspx>
4. Anderson, R y L. Harrington. *West Nile Virus*. Medical Entomology Extension. CORNELL Cooperative Extension. CORNELL University. Disponible en: <http://www.entomology.cornell.edu/MedEnt/WestNileFS/WestNileFS.html>
5. Apperson, C., et al. 2002. *Host-feeding habits of Culex and other mosquitoes (Diptera: Culicidae) in the Borough of Queens in New York City, with characters and techniques for identification of Culex mosquitoes*. Journal of Medical Entomology 39(5): 777-785.
6. Apperson, C., et al. 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.
7. Beasley, D., et al. 2004. *Genome sequence and attenuating mutations in West Nile Virus isolate from Mexico*. Emerging Infectious Diseases 10(12): 2221-2224.
8. Biosoft International. *TaqMan Probes*. 2007. PREMIER Biosoft International. Copyright 1994 Disponible en: http://www.premierbiosoft.com/tech_notes/TaqMan.html.
9. Braks, M. y R.T. Cardé. 2007. *Improving efficacy of Box gravid traps for collecting Culex quinquefasciatus*. Journal of Vector Ecology 32(1):83-89.
10. Brinton, M. 2002. *The molecular biology of West Nile Virus: A new invader of the western hemisphere*. Annu. Rev. Microbiol. 56:371-402.
11. Burke, D.S. y T.P. Monath. 2001. En: Knipe, D. y P. Howley, eds., *Fields Virology*, Volumen I. Cuarta Edición. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA. Pp. 1043-1125.
12. Campbell, G., et al. 2002. *West Nile Virus*. THE LANCET Infectious Diseases 2: 519-29.
13. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). 2005. *Information of Arboviral Encephalitis*. Division of Vector-Borne Infectious Diseases. (a). Disponible en: <http://www.cdc.gov/ncidod/dvbid/arbor/arbdet.htm>
14. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). 2005. *Flowchart: West Nile Virus transmission cycle*. Division of Vector-Borne Infectious Diseases. (b). Disponible en: <http://www.cdc.gov/ncidod/dvbid/westnile/cycle.htm>

15. Cruz, V., *et al.* 2005. *Short report: Serological evidence of West Nile Virus activity in El Salvador.* The American Society of Tropical Medicine and Hygiene 72(5): 612-615.
16. Dauphin, G., *et al.* 2004. *West Nile: worldwide current situation in animals and humans.* Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases 27: 343-355.
17. Davis, C. *et al.*, 2003. *Genetic variation among temporally and geographically distinct West Nile Virus isolates, United States, 2001, 2002.* Emerging Infectious Diseases. 9(11): 1423-1429.
18. Davis, N. y R. Shannon. 1929. *Studies on yellow fever in South America. Transmission experiments with certain species of Culex and Aedes.* Journal of Experimental Medicine 50: 803-808.
19. Elizondo-Quiroga, A., *et al.* 2006. *Gonotrophic cycle and survivorship of Culex quinquefasciatus (Diptera: Culicidae) using sticky ovitraps in Monterrey, northeastern Mexico.* Journal of American Mosquito Control Association 22(1): 10-14. (a).
20. Elizondo-Quiroga, A., *et al.* 2006. *Host-feeding preference of Culex quinquefasciatus in Monterrey, Northeastern Mexico.* Journal of American Mosquito Control Association. 22(4): 654-661. (b).
21. Enchanted Learning Search. *Mosquito Life Cycle.* Copyright 2000-2007. Disponible en: <http://www.enchantedlearning.com/subjects/insects/mosquito/lifecycle.shtml>
22. Goddard, L., *et al.* 2002. *Vector competence of California mosquitoes for West Nile virus.* Emerging Infectious Diseases 8(12): 1385-91.
23. González, T., *et al.* 1999. *Insecticide Resistance in a Culex quinquefasciatus Strain in Rio de Janeiro, Brazil.* Mem Institute Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro 94(1): 121-122.
24. Gould, L. y E. Fikrig. 2004. *West Nile Virus: A growing concern?* The Journal of Clinical Investigation 113(8): 1102-1107.
25. Important Arbovirus Vector Mosquito Species. 2005. Attachment 4.A. *Virginia Arbovirus Plan.*
26. Instituto Nacional de Sismología, Vulcanología, Meteorología e Hidrología (INSIVUMEH). 2006. *Información climática de Puerto Barrios.* Guatemala.
27. Invasive Species Specialist Group (ISSG). 2006. *Culex quinquefasciatus (insect).* Global Invasive Species Database. Disponible en: <http://www.issg.org/database/species/ecology.asp?si=482&fr=1&sts=sss>
28. Jarratt, J., *et al.* 2004. *The southern house mosquito and related species: Biology and Control.* Mississippi State University Extension Service, Publication No. 2336.
29. Johnson, B. W. 2004. *Molecular detection and Identification of Arboviruses by RT-PCR, Taqman RT-PCR, and SYBR Green RT-PCR Assays.* Modificado de R.S. Lanciotti.

30. Karabatsos, N. 1985. *International Catalogue of ARBOVIRUSES*. Tercera edición. The American Society of Tropical Medicine and Hygiene,
31. Keen, N. 1999. *Flavivirus*. Disponible en: <http://www.stanford.edu/group/virus/1999/asb-flavi/overview.htm>
32. Kilpatrick, M., *et al.* 2006. *Host heterogeneity dominates West Nile Virus transmission*. Proceedings of the Royal Society B 273: 2327-2333.
33. Kilpatrick, M., *et al.* 2004. *Quantitative risk assessment of the pathways by which West Nile Virus could reach Hawaii*. EcoHealth Journal Consortium 1: 205-209.
34. Kilpatrick, M., *et al.* 2006. *West Nile Virus epidemics in North America are driven by shifts in mosquito feeding behavior*. PLOS Biology 4(4): e82.
35. Kilpatrick, M., *et al.* 2005. *West Nile Virus risk assessment and the bridge vector paradigm*. Emerging Infectious Diseases 11(3): 425-429.
36. Komar, N. y G.G. Clark. 2006. *West Nile Virus activity in Latin America and The Caribbean*. Pan American Journal of Public Health 19(2): 112-117.
37. Kuno, G., *et al.* 1998. *Phylogeny of the genus Flavivirus*. Journal of Virology 72(1): 73-83.
38. Lanciotti, R. 2003. *Molecular amplification assays for the detection of Flavivirus*. Advances in Virus Research 61: 67-99.
39. Lanciotti, R., *et al.* 1999. *Origin of West Nile Virus responsible of an outbreak of encephalitis in the northeastern United States*. Science 286(5448):2333-2337.
40. Lanciotti, R., *et al.* 2000. *Rapid Detection of West Nile Virus from human clinical specimens, field-collected mosquitoes, and avian samples by a TaqMan Reverse Transcriptase-PCR Assay*. Journal of Clinical Microbiology 38(11): 4066-4071.
41. Leake, C.J., *et al.* 1986. *Virus isolations from mosquitoes collected during 1982 Japanese encephalitis epidemic in northern Thailand*. Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 80(5): 831-837.
42. Lillibridge, K., *et al.* 2004. *The 2002 introduction of West Nile virus into Harris County, Texas, an area historically endemic for St. Louis Encephalitis*. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 70(6): 676-681.
43. Mans, N., *et al.* 2004. *West Nile Virus in mosquitoes of Northern Ohio, 2001 – 2002*. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 70(5): 562-565.
44. Meadows, R. 2006. *Biodiversity may curb West Nile Virus*. Society for Conservation Biology 7(1).
45. Morales-Betoulle, M. *et al.* 2006. *West Nile Virus in horses, Guatemala*. Emerging Infectious Diseases 12(6): 1038-1039.
46. National Park Service (NPS). *Mosquito Monitoring and Management*. Disponible en: <http://www.nps.gov/fiis/naturescience/mosquito-management.htm>

47. New South Wales (NSW) Health. 1996. *Culex quinquefasciatus*. New South Wales Arbovirus Surveillance and Vector Monitoring Program. Disponible en: <http://www.arbovirus.health.nsw.gov.au/areas/arbovirus/mosquit/culexquinquefasciatus.htm>
48. New York State Department of Health. 2000. *Appendix G. Arthropod-borne disease program*. Mosquito surveillance guidelines.
49. O'Meara, CF.; F.E. Vose y D.B. Carlson. 1989. *Environmental factors influencing oviposition by Culex (Culex) (Diptera: Culicidae) in two types of traps*. Journal of Medical Entomology 26(6): 528-534.
50. Organización Panamericana de la Salud (OPS). 2000. *Análisis de situación de salud en las Américas*. Boletín Epidemiológico 21(4).
51. Petersen, L. y A Marfin. 2002. *West Nile Virus: A primer for the Clinician*. Annals of Internal Medicine 137(3): 173-179.
52. Petersen, L. y J. Roehrig. 2001. *West Nile Virus: A reemerging global pathogen*. Emerging Infectious Diseases 7(4): 611-614.
53. Stein, M.; G. Oria, y W. Almirón. 2002. *Principales criaderos para Aedes aegypti y culícidos asociados, Argentina*. Rev. Saúde Pública 36(5): 627-630.
54. Rapoole, J., et al. 2000. *Migratory birds and spread of West Nile Virus in the western hemisphere*. Emerging Infectious Diseases 6(4): 319-328.
55. Reisen, W. 2005. *Mosquito field infection rates and transmission risk are related to avian and mosquito host competence*. National Conference on West Nile virus in the United States. Center for Vector-Borne Diseases. School of Veterinary Medicine, University of California.
56. Reiter, P. 1983. *A portable, battery-powered trap for collecting gravid Culex mosquitoes*. Mosquito News. 43:496-498.
57. Reiter, P. 1987. *A revised version of the CDC gravid mosquito trap*. Journal of American Mosquito Control Association. 3: 325-327.
58. Salazar, MJ. y LI. Moncada. 2004. *Life cycle of Culex quinquefasciatus Say (Diptera: Culicidae) under controlled conditions*. Biomedica 24(4): 385-392.
59. Service, M.W. 1993. *Mosquito Ecology: Field Sampling Methods*. 2a ed. Chapman & Hall. 954pp.
60. Shroyer, D. *Saint Louis Encephalitis: A Florida problem*. Entomology and Nematology Department, Florida Cooperative Extension Service, Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida. Junio, 2004. Disponible en: http://edis.ifas.ufl.edu/BODY_MG337

61. Tiawsirisup, S. 2004. *Susceptibility of Ochlerotatus trivittatus (Coq.), Aedes albopictus (Skuse), and Culex pipiens (L.) to West Nile Virus infection.* Vector-Borne and Zoonotic Diseases 4(3): 190-197.
62. Turell, M., et al. 2001. *Potencial North America Vectors of West Nile Virus.* Annals of the New York Academy of Sciences 951: 317-324.
63. Vanlandingham, D. et al. 2004. *Real-time Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction quantification of West Nile Virus transmitted by Culex pipiens quinquefasciatus.* The American Society of Tropical Medicine and Hygiene 71(1): 120-123.
64. Weaver, S.C. *Host range, amplification and arboviral disease emergence.* Center for Biodefense and Emerging Infectious Diseases and Department of Pathology, University of Texas Medical Branch, Galveston, Texas, USA.
65. White, B. et al. 2006. *West Nile Virus in mosquitoes of northern Ohio, 2003.* American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 75(2): 346-349.
66. World Health Organization (WHO). 2007. *West Nile Virus.* Disponible en: http://www.who.int/vaccine_research/diseases/vector/en/index3.html
67. Zanotto, PM. et al. 1996. *Population dynamics of flaviviruses revealed by molecular phylogenies.* Proc Natl Acad Sci USA 93(2): 548-553.
68. Zinser, M. et al. 2004. *Culex quinquefasciatus (Diptera: Culicidae) as a potencial West Nile virus vector in Tucson, Arizona: Blood meal analysis indicates feeding on both humans and birds.* Journal of Insect Science 4(20): 3pp.

XI. ANEXOS

A. Información de los pools de zancudos utilizados

Cuadro 5. Información de los pools de zancudos utilizados.

Código	Fecha de colecta	Cuadrante	Tipo de Trampa	No. Grávidas	No. Alimentadas	No. Vacías
GU-2006-00720	09-Mar-06	8	Grávida	12		
GU-2006-00722	09-Mar-06	7	CDC			2
GU-2006-00726	09-Mar-06	7	Grávida	6		2
GU-2006-00727	09-Mar-06	7	Grávida		1	
GU-2006-00730	09-Mar-06	8	CDC			1
GU-2006-00731	09-Mar-06	8	CDC		2	
GU-2006-00761	09-Mar-06	5	CDC			2
GU-2006-00768	09-Mar-06	5	Grávida	1		
GU-2006-00787	09-Mar-06	1	Grávida			2
GU-2006-00809	10-Mar-06	4	CDC			10
GU-2006-00810	10-Mar-06	4	Grávida			1
GU-2006-00811	10-Mar-06	4	Grávida		1	
GU-2006-00813	10-Mar-06	10	Grávida	1		1
GU-2006-00818	10-Mar-06	10	CDC			6
GU-2006-00822	10-Mar-06	7	Grávida	13		
GU-2006-00855	08-Mar-06	7	CDC			1
GU-2006-00877	10-Mar-06	5	CDC			2
GU-2006-00881	12-Mar-06	8	Grávida	41		4
GU-2006-00882	12-Mar-06	8	Grávida		3	
GU-2006-00886	12-Mar-06	8	CDC			8
GU-2006-00894	12-Mar-06	10	CDC			3
GU-2006-00895	12-Mar-06	10	CDC		1	
GU-2006-00901	12-Mar-06	10	Grávida	2		1

Continuación Cuadro 5

Código	Fecha de colecta	Cuadrante	Tipo de Trampa	No. Grávidas	No. Alimentadas	No. Vacías
GU-2006-00908	12-Mar-06	5	CDC			1
GU-2006-00913	12-Mar-06	5	Grávida			2
GU-2006-00943	12-Mar-06	4	CDC	1		
GU-2006-00947	15-Mar-06	9	Grávida	50		
GU-2006-00948	15-Mar-06	9	Grávida	50		
GU-2006-00949	15-Mar-06	9	Grávida	43		7
GU-2006-00951	15-Mar-06	9	Grávida		9	
GU-2006-00958	15-Mar-06	9	Grávida	27		2
GU-2006-00967	15-Mar-06	6	CDC			5
GU-2006-00968	15-Mar-06	6	CDC		2	
GU-2006-00971	15-Mar-06	6	Grávida	42		5
GU-2006-00972	15-Mar-06	6	CDC		4	
GU-2006-00978	15-Mar-06	6	CDC			1
GU-2006-00983	14-Mar-06	2	Grávida	1		
GU-2006-00997	14-Mar-06	6	Grávida	13		1
GU-2006-00998	14-Mar-06	6	CDC		1	
GU-2006-01002	14-Mar-06	6	CDC	1		
GU-2006-01007	14-Mar-06	9	Grávida	24		
GU-2006-01009	14-Mar-06	9	CDC			3
GU-2006-01013	13-Mar-06	6	Grávida	35		1
GU-2006-01014	12-Mar-06	6	Grávida		2	
GU-2006-01021	13-Mar-06	10	Grávida	3		
GU-2006-01025	13-Mar-06	10	CDC	5		
GU-2006-01026	13-Mar-06	10	CDC		2	
GU-2006-01030	13-Mar-06	4	Grávida	42		3
GU-2006-01031	13-Mar-06	4	Grávida		4	

Continuación Cuadro 5

Código	Fecha de colecta	Cuadrante	Tipo de Trampa	No. Grávidas	No. Alimentadas	No. Vacías
GU-2006-01037	13-Mar-06	4	CDC			1
GU-2006-01040	13-Mar-06	6	CDC	1		4
GU-2006-01041	13-Mar-06	6	CDC		2	
GU-2006-01138	07-Apr-06	9	Grávida			50
GU-2006-01139	07-Apr-06	9	Grávida	2		3
GU-2006-01140	07-Apr-06	9	Grávida		5	
GU-2006-01149	07-Apr-06	4	CDC	1		1
GU-2006-01153	06-Apr-06	7	Grávida	1		
GU-2006-01166	06-Apr-06	1	CDC			1
GU-2006-01172	06-Apr-06	2	CDC			1
GU-2006-01202	07-Apr-06	4	Grávida	4		
GU-2006-01207	07-Apr-06	10	CDC	1		1
GU-2006-01211	07-Apr-06	10	Grávida	17		2
GU-2006-01212	07-Apr-06	10	Grávida		1	
GU-2006-01215	06-Apr-06	10	Grávida	25		3
GU-2006-01216	06-Apr-06	10	Grávida		2	
GU-2006-01222	06-Apr-06	10	CDC			1
GU-2006-01224	06-Apr-06	8	Grávida	5		
GU-2006-01227	06-Apr-06	6	Grávida			1
GU-2006-01228	06-Apr-06	6	Grávida		2	
GU-2006-01230	06-Apr-06	5	CDC	4		
GU-2006-01236	06-Apr-06	4	Grávida	11		3
GU-2006-01237	06-Apr-06	4	Grávida		4	
GU-2006-01243	06-Apr-06	5	Grávida	3		1
GU-2006-01245	07-Apr-06	7	Grávida	3		

Continuación Cuadro 5

Código	Fecha de colecta	Cuadrante	Tipo de Trampa	No. Grávidas	No. Alimentadas	No. Vacías
GU-2006-01250	07-Apr-06	8	Grávida	5		
GU-2006-01251	07-Apr-06	8	Grávida		1	
GU-2006-01256	07-Apr-06	6	CDC			2
GU-2006-01257	07-Apr-06	6	CDC		3	
GU-2006-01258	07-Apr-06	8	CDC			2
GU-2006-01266	07-Apr-06	4	Grávida	3		
GU-2006-01273	06-Apr-06	6	CDC			2
GU-2006-01276	07-Apr-06	6	Grávida	3		5
GU-2006-01407	10-May-06	4	CDC			4
GU-2006-01419	10-May-06	6	CDC			4
GU-2006-01426	10-May-06	7	CDC	4		
GU-2006-01461	11-May-06	3	CDC			4
GU-2006-01462	11-May-06	3	CDC		1	
GU-2006-01467	11-May-06	3	Grávida	1		
GU-2006-01469	10-May-06	10	Grávida	28		1
GU-2006-01473	10-May-06	4	CDC	3		5
GU-2006-01474	10-May-06	4	Grávida		2	
GU-2006-01483	11-May-06	9	Grávida	3		
GU-2006-01485	11-May-06	8	Grávida	14		
GU-2006-01493	10-May-06	6	CDC	16		18
GU-2006-01516	14-Jun-06	8	Grávida			1
GU-2006-01517	14-Jun-06	8	Grávida		2	
GU-2006-01524	14-Jun-06	3	Grávida			
GU-2006-01533	14-Jun-06	4	Grávida		3	
GU-2006-01534	14-Jun-06	4	Grávida	2		

Continuación Cuadro 5

Código	Fecha de colecta	Cuadrante	Tipo de Trampa	No. Grávidas	No. Alimentadas	No. Vacías
GU-2006-01542	15-Jun-06	7	Grávida	9		1
GU-2006-01550	15-Jun-06	3	Grávida	5		1
GU-2006-01554	16-Jun-06	10	Grávida	22		
GU-2006-01565	18-Jun-06	6	Grávida	8		
GU-2006-01566	18-Jun-06	6	Grávida		1	
GU-2006-01573	18-Jun-06	10	Grávida	2		
GU-2006-01581	19-Jun-06	9	Grávida	13		
GU-2006-01582	19-Jun-06	9	Grávida		5	
GU-2006-01611	16-Jun-06	6	Grávida	7		1
GU-2006-01622	19-Jun-06	5	Grávida	5		
GU-2006-01629	14-Jun-06	7	CDC			1
GU-2006-01646	14-Jun-06	4	CDC	2		45
GU-2006-01665	14-Jun-06	9	CDC			1
GU-2006-01666	14-Jun-06	9	CDC		1	
GU-2006-01763	15-Jun-06	1	CDC			2
GU-2006-01771	14-Jun-06	3	CDC			3
GU-2006-01870	16-Jun-06	6	CDC			3
GU-2006-01902	16-Jun-06	10	CDC			6
GU-2006-01940	18-Jun-06	6	CDC			17
GU-2006-01941	18-Jun-06	6	CDC		9	
GU-2006-01987	18-Jun-06	10	CDC			11
GU-2006-02008	19-Jun-06	5	CDC			3
GU-2006-02233	20-Jul-06	8	Grávida	6		1
GU-2006-02243	20-Jul-06	6	Grávida	9		1
GU-2006-02245	20-Jul-06	7	Grávida	9		
GU-2006-02251	21-Jul-06	9	Grávida	50		

Continuación Cuadro 5

Código	Fecha de colecta	Cuadrante	Tipo de Trampa	No. Grávidas	No. Alimentadas	No. Vacías
GU-2006-02252	21-Jul-06	9	Grávida	3		
GU-2006-02256	21-Jul-06	5	Grávida	4		
GU-2006-02257	21-Jul-06	5	Grávida		1	
GU-2006-02259	21-Jul-06	4	Grávida	4		
GU-2006-02262	21-Jul-06	3	Grávida	1		
GU-2006-02270	21-Jul-06	10	Grávida	4		
GU-2006-02275	22-Jul-06	6	CDC	1		1
GU-2006-02291	22-Jul-06	7	CDC			2
GU-2006-02306	20-Jul-06	8	CDC			1
GU-2006-02319	20-Jul-06	2	CDC			1
GU-2006-02405	21-Jul-06	4	CDC			4
GU-2006-02416	29-Aug-06	8	Grávida			1
GU-2006-02417	29-Aug-06	8	Grávida		3	
GU-2006-02558	31-Aug-06	7	Grávida	4		
GU-2006-02561	31-Aug-06	8	Grávida	7		
GU-2006-02563	31-Aug-06	3	Grávida	5		
GU-2006-02588	31-Aug-06	6	CDC			1
GU-2006-02593	31-Aug-06	6	Grávida	2		
GU-2006-02601	31-Aug-06	8	CDC			3
GU-2006-02602	31-Aug-06	8	CDC		1	
GU-2006-02610	01-Sep-06	6	Grávida	15		
GU-2006-02619	03-Sep-06	4	Grávida	6		5
GU-2006-02620	03-Sep-06	4	Grávida		5	
GU-2006-02648	03-Sep-06	4	CDC			50
GU-2006-02649	03-Sep-06	4	CDC	2		16
GU-2006-02650	03-Sep-06	4	CDC		1	

Continuación Cuadro 5

Código	Fecha de colecta	Cuadrante	Tipo de Trampa	No. Grávidas	No. Alimentadas	No. Vacías
GU-2006-02683	03-Sep-06	9	Grávida	25		
GU-2006-02692	01-Sep-06	5	CDC			1
GU-2006-02703	03-Sep-06	5	Grávida	2		
GU-2006-02751	05-Sep-06	10	Grávida	9		
GU-2006-02752	05-Sep-06	10	Grávida		2	
GU-2006-02757	05-Sep-06	10	CDC	1		
GU-2006-02779	04-Sep-06	4	CDC		3	
GU-2006-02780	04-Sep-06	4	CDC	20		
GU-2006-02785	04-Sep-06	4	Grávida	6		
GU-2006-02786	04-Sep-06	4	Grávida		5	
GU-2006-02810	04-Sep-06	9	Grávida		1	
GU-2006-02811	04-Sep-06	9	Grávida	12		
GU-2006-02820	04-Sep-06	10	Grávida	17		1
GU-2006-02821	04-Sep-06	10	Grávida		2	
GU-2006-02898	23-Sep-06	7	Grávida	2		
GU-2006-02912	23-Sep-06	8	Grávida	5		
GU-2006-02915	23-Sep-06	8	CDC	2		13
GU-2006-02916	23-Sep-06	8	CDC		4	
GU-2006-02929	23-Sep-06	6	Grávida	1		
GU-2006-02933	23-Sep-06	6	CDC	1		4
GU-2006-02934	23-Sep-06	6	CDC		1	
GU-2006-02941	24-Sep-06	9	CDC	3		
GU-2006-02943	24-Sep-06	9	Grávida	6		
GU-2006-02945	24-Sep-06	5	Grávida	1		
GU-2006-02946	24-Sep-06	5	Grávida		2	
GU-2006-02948	24-Sep-06	5	CDC	1		2

Continuación Cuadro 5

Código	Fecha de colecta	Cuadrante	Tipo de Trampa	No. Grávidas	No. Alimentadas	No. Vacías
GU-2006-02954	24-Sep-06	3	CDC			6
GU-2006-02966	24-Sep-06	4	Grávida	11		11
GU-2006-02967	24-Sep-06	4	Grávida		10	
GU-2006-02973	24-Sep-06	4	CDC			40
GU-2006-02974	24-Sep-06	4	CDC		3	
GU-2006-02997	24-Sep-06	10	Grávida	10		
GU-2006-02998	24-Sep-06	10	Grávida		1	
GU-2006-08244	26-Oct-06	6	Grávida	3		1
GU-2006-08246	26-Oct-06	6	CDC			3
GU-2006-08247	26-Oct-06	6	CDC		1	
GU-2006-08252	26-Oct-06	8	Grávida		1	
GU-2006-08256	26-Oct-06	8	CDC			3
GU-2006-08257	26-Oct-06	8	CDC		2	
GU-2006-08326	26-Oct-06	7	Grávida		2	
GU-2006-08327	26-Oct-06	7	Grávida	20		
GU-2006-08351	27-Oct-06	5	Grávida	2		
GU-2006-08354	27-Oct-06	5	CDC			2
GU-2006-08363	27-Oct-06	9	CDC			1
GU-2006-08370	27-Oct-06	9	Grávida	1		1
GU-2006-08373	27-Oct-06	10	CDC			3
GU-2006-08377	27-Oct-06	10	Grávida	6		
GU-2006-08382	27-Oct-06	3	CDC			9
GU-2006-08383	27-Oct-06	3	CDC		1	
GU-2006-08390	27-Oct-06	4	Grávida	13		4
GU-2006-08391	27-Oct-06	4	Grávida		2	
GU-2006-08394	27-Oct-06	4	CDC			50

Continuación Cuadro 5

Código	Fecha de colecta	Cuadrante	Tipo de Trampa	No. Grávidas	No. Alimentadas	No. Vacías
GU-2006-08395	27-Oct-06	4	CDC			32
GU-2006-00720	09-Mar-06	8	Grávida	12		
GU-2006-00722	09-Mar-06	7	CDC			2
GU-2006-00726	09-Mar-06	7	Grávida	6		2
GU-2006-00727	09-Mar-06	7	Grávida		1	
GU-2006-00730	09-Mar-06	8	CDC			1
GU-2006-00731	09-Mar-06	8	CDC		2	
GU-2006-00761	09-Mar-06	5	CDC			2
GU-2006-00768	09-Mar-06	5	Grávida	1		
GU-2006-00787	09-Mar-06	1	Grávida			2
GU-2006-00809	10-Mar-06	4	CDC			10
GU-2006-00810	10-Mar-06	4	Grávida			1
GU-2006-00811	10-Mar-06	4	Grávida		1	
GU-2006-00813	10-Mar-06	10	Grávida	1		1
GU-2006-00818	10-Mar-06	10	CDC			6
GU-2006-00822	10-Mar-06	7	Grávida	13		
GU-2006-00855	08-Mar-06	7	CDC			1
GU-2006-00877	10-Mar-06	5	CDC			2
GU-2006-00881	12-Mar-06	8	Grávida	41		4
GU-2006-00882	12-Mar-06	8	Grávida		3	
GU-2006-00886	12-Mar-06	8	CDC			8
GU-2006-00894	12-Mar-06	10	CDC			3
GU-2006-00895	12-Mar-06	10	CDC		1	
GU-2006-00901	12-Mar-06	10	Grávida	2		1
GU-2006-00908	12-Mar-06	5	CDC			1
GU-2006-00913	12-Mar-06	5	Grávida			2

Continuación Cuadro 5

Código	Fecha de colecta	Cuadrante	Tipo de Trampa	No. Grávidas	No. Alimentadas	No. Vacías
GU-2006-00943	12-Mar-06	4	CDC	1		
GU-2006-00948	15-Mar-06	9	Grávida	50		
GU-2006-00949	15-Mar-06	9	Grávida	43		7
GU-2006-00951	15-Mar-06	9	Grávida		9	
GU-2006-00958	15-Mar-06	9	Grávida	27		2
GU-2006-00967	15-Mar-06	6	CDC			5
GU-2006-00968	15-Mar-06	6	CDC		2	
GU-2006-00971	15-Mar-06	6	Grávida	42		5
GU-2006-00972	15-Mar-06	6	CDC		4	
GU-2006-00978	15-Mar-06	6	CDC			1
GU-2006-00983	14-Mar-06	2	Grávida	1		
GU-2006-00997	14-Mar-06	6	Grávida	13		1
GU-2006-00998	14-Mar-06	6	CDC		1	
GU-2006-01002	14-Mar-06	6	CDC	1		
GU-2006-01007	14-Mar-06	9	Grávida	24		
GU-2006-01009	14-Mar-06	9	CDC			3
GU-2006-01013	13-Mar-06	6	Grávida	35		1
GU-2006-01014	12-Mar-06	6	Grávida		2	
GU-2006-01021	13-Mar-06	10	Grávida	3		
GU-2006-01025	13-Mar-06	10	CDC	5		
GU-2006-01026	13-Mar-06	10	CDC		2	
GU-2006-01030	13-Mar-06	4	Grávida	42		3
GU-2006-01031	13-Mar-06	4	Grávida		4	
GU-2006-01037	13-Mar-06	4	CDC			1
GU-2006-01040	13-Mar-06	6	CDC	1		4
GU-2006-01041	13-Mar-06	6	CDC		2	

Continuación Cuadro 5

Código	Fecha de colecta	Cuadrante	Tipo de Trampa	No. Grávidas	No. Alimentadas	No. Vacías
GU-2006-01138	07-Apr-06	9	Grávida			50
GU-2006-01140	07-Apr-06	9	Grávida		5	
GU-2006-01149	07-Apr-06	4	CDC	1		1
GU-2006-01153	06-Apr-06	7	Grávida	1		
GU-2006-01166	06-Apr-06	1	CDC			1
GU-2006-01172	06-Apr-06	2	CDC			1
GU-2006-01202	07-Apr-06	4	Grávida	4		
GU-2006-01207	07-Apr-06	10	CDC	1		1
GU-2006-01211	07-Apr-06	10	Grávida	17		2
GU-2006-01212	07-Apr-06	10	Grávida		1	
GU-2006-01215	06-Apr-06	10	Grávida	25		3
GU-2006-01216	06-Apr-06	10	Grávida		2	
GU-2006-01222	06-Apr-06	10	CDC			1
GU-2006-01224	06-Apr-06	8	Grávida	5		
GU-2006-01227	06-Apr-06	6	Grávida			1
GU-2006-01228	06-Apr-06	6	Grávida		2	
GU-2006-01230	06-Apr-06	5	CDC	4		
GU-2006-01236	06-Apr-06	4	Grávida	11		3
GU-2006-01237	06-Apr-06	4	Grávida		4	
GU-2006-01243	06-Apr-06	5	Grávida	3		1
GU-2006-01245	07-Apr-06	7	Grávida	3		
GU-2006-01249	07-Apr-06	5	Grávida	2		
GU-2006-01250	07-Apr-06	8	Grávida	5		
GU-2006-01251	07-Apr-06	8	Grávida		1	
GU-2006-01256	07-Apr-06	6	CDC			2
GU-2006-01257	07-Apr-06	6	CDC		3	

Continuación Cuadro 5

Código	Fecha de colecta	Cuadrante	Tipo de Trampa	No. Grávidas	No. Alimentadas	No. Vacías
GU-2006-01258	07-Apr-06	8	CDC			2
GU-2006-01273	06-Apr-06	6	CDC			2
GU-2006-01276	07-Apr-06	6	Grávida	3		5
GU-2006-01407	10-May-06	4	CDC			4
GU-2006-01419	10-May-06	6	CDC			4
GU-2006-01426	10-May-06	7	CDC	4		
GU-2006-01461	11-May-06	3	CDC			4
GU-2006-01462	11-May-06	3	CDC		1	
GU-2006-01467	11-May-06	3	Grávida	1		
GU-2006-01469	10-May-06	10	Grávida	28		1
GU-2006-01473	10-May-06	4	CDC	3		5
GU-2006-01474	10-May-06	4	Grávida		2	
GU-2006-01483	11-May-06	9	Grávida	3		
GU-2006-01485	11-May-06	8	Grávida	14		
GU-2006-01493	10-May-06	6	CDC	16		18
GU-2006-01516	14-Jun-06	8	Grávida			1
GU-2006-01517	14-Jun-06	8	Grávida		2	
GU-2006-01524	14-Jun-06	3	Grávida			
GU-2006-01533	14-Jun-06	4	Grávida		3	
GU-2006-01534	14-Jun-06	4	Grávida	2		
GU-2006-01542	15-Jun-06	7	Grávida	9		1
GU-2006-01547	15-Jun-06	8	Grávida	5		
GU-2006-01550	15-Jun-06	3	Grávida	5		1
GU-2006-01554	16-Jun-06	10	Grávida	22		
GU-2006-01565	18-Jun-06	6	Grávida	8		
GU-2006-01566	18-Jun-06	6	Grávida		1	

Continuación Cuadro 5

Código	Fecha de colecta	Cuadrante	Tipo de Trampa	No. Grávidas	No. Alimentadas	No. Vacías
GU-2006-01573	18-Jun-06	10	Grávida	2		
GU-2006-01582	19-Jun-06	9	Grávida		5	
GU-2006-01611	16-Jun-06	6	Grávida	7		1
GU-2006-01622	19-Jun-06	5	Grávida	5		
GU-2006-01629	14-Jun-06	7	CDC			1
GU-2006-01646	14-Jun-06	4	CDC	2		45
GU-2006-01665	14-Jun-06	9	CDC			1
GU-2006-01666	14-Jun-06	9	CDC		1	
GU-2006-01763	15-Jun-06	1	CDC			2
GU-2006-01771	14-Jun-06	3	CDC			3
GU-2006-01870	16-Jun-06	6	CDC			3
GU-2006-01902	16-Jun-06	10	CDC			6
GU-2006-01940	18-Jun-06	6	CDC			17
GU-2006-01941	18-Jun-06	6	CDC		9	
GU-2006-01987	18-Jun-06	10	CDC			11
GU-2006-02008	19-Jun-06	5	CDC			3
GU-2006-02233	20-Jul-06	8	Grávida	6		1
GU-2006-02243	20-Jul-06	6	Grávida	9		1
GU-2006-02245	20-Jul-06	7	Grávida	9		
GU-2006-02251	21-Jul-06	9	Grávida	50		
GU-2006-02252	21-Jul-06	9	Grávida	3		
GU-2006-02253	21-Jul-06	9	Grávida		5	
GU-2006-02256	21-Jul-06	5	Grávida	4		
GU-2006-02257	21-Jul-06	5	Grávida		1	
GU-2006-02259	21-Jul-06	4	Grávida	4		
GU-2006-02262	21-Jul-06	3	Grávida	1		

Continuación Cuadro 5

Código	Fecha de colecta	Cuadrante	Tipo de Trampa	No. Grávidas	No. Alimentadas	No. Vacías
GU-2006-02270	21-Jul-06	10	Grávida	4		
GU-2006-02291	22-Jul-06	7	CDC			2
GU-2006-02306	20-Jul-06	8	CDC			1
GU-2006-02319	20-Jul-06	2	CDC			1
GU-2006-02405	21-Jul-06	4	CDC			4
GU-2006-02416	29-Aug-06	8	Grávida			1
GU-2006-02417	29-Aug-06	8	Grávida		3	
GU-2006-02558	31-Aug-06	7	Grávida	4		
GU-2006-02561	31-Aug-06	8	Grávida	7		
GU-2006-02563	31-Aug-06	3	Grávida	5		
GU-2006-02588	31-Aug-06	6	CDC			1
GU-2006-02593	31-Aug-06	6	Grávida	2		
GU-2006-02601	31-Aug-06	8	CDC			3
GU-2006-02602	31-Aug-06	8	CDC		1	
GU-2006-02610	01-Sep-06	6	Grávida	15		
GU-2006-02619	03-Sep-06	4	Grávida	6		5
GU-2006-02620	03-Sep-06	4	Grávida		5	
GU-2006-02648	03-Sep-06	4	CDC			50
GU-2006-02649	03-Sep-06	4	CDC	2		16
GU-2006-02650	03-Sep-06	4	CDC		1	
GU-2006-02683	03-Sep-06	9	Grávida	25		
GU-2006-02690	01-Sep-06	5	Grávida	3		
GU-2006-02692	01-Sep-06	5	CDC			1
GU-2006-02703	03-Sep-06	5	Grávida	2		
GU-2006-02751	05-Sep-06	10	Grávida	9		
GU-2006-02752	05-Sep-06	10	Grávida		2	

Continuación Cuadro 5

Código	Fecha de colecta	Cuadrante	Tipo de Trampa	No. Grávidas	No. Alimentadas	No. Vacías
GU-2006-02757	05-Sep-06	10	CDC	1		
GU-2006-02780	04-Sep-06	4	CDC	20		
GU-2006-02785	04-Sep-06	4	Grávida	6		
GU-2006-02786	04-Sep-06	4	Grávida		5	
GU-2006-02810	04-Sep-06	9	Grávida		1	
GU-2006-02811	04-Sep-06	9	Grávida	12		
GU-2006-02820	04-Sep-06	10	Grávida	17		1
GU-2006-02821	04-Sep-06	10	Grávida		2	
GU-2006-02898	23-Sep-06	7	Grávida	2		
GU-2006-02912	23-Sep-06	8	Grávida	5		
GU-2006-02915	23-Sep-06	8	CDC	2		13
GU-2006-02916	23-Sep-06	8	CDC		4	
GU-2006-02929	23-Sep-06	6	Grávida	1		
GU-2006-02933	23-Sep-06	6	CDC	1		4
GU-2006-02934	23-Sep-06	6	CDC		1	
GU-2006-02941	24-Sep-06	9	CDC	3		
GU-2006-02943	24-Sep-06	9	Grávida	6		
GU-2006-02945	24-Sep-06	5	Grávida	1		
GU-2006-02946	24-Sep-06	5	Grávida		2	
GU-2006-02948	24-Sep-06	5	CDC	1		2
GU-2006-02954	24-Sep-06	3	CDC			6
GU-2006-02961	24-Sep-06	3	Grávida	22		
GU-2006-02966	24-Sep-06	4	Grávida	11		11
GU-2006-02967	24-Sep-06	4	Grávida		10	
GU-2006-02973	24-Sep-06	4	CDC			40
GU-2006-02974	24-Sep-06	4	CDC		3	

Continuación Cuadro 5

Código	Fecha de colecta	Cuadrante	Tipo de Trampa	No. Grávidas	No. Alimentadas	No. Vacías
GU-2006-02997	24-Sep-06	10	Grávida	10		
GU-2006-08244	26-Oct-06	6	Grávida	3		1
GU-2006-08246	26-Oct-06	6	CDC			3
GU-2006-08247	26-Oct-06	6	CDC		1	
GU-2006-08252	26-Oct-06	8	Grávida		1	
GU-2006-08256	26-Oct-06	8	CDC			3
GU-2006-08257	26-Oct-06	8	CDC		2	
GU-2006-08326	26-Oct-06	7	Grávida		2	
GU-2006-08327	26-Oct-06	7	Grávida	20		
GU-2006-08351	27-Oct-06	5	Grávida	2		
GU-2006-08354	27-Oct-06	5	CDC			2
GU-2006-08363	27-Oct-06	9	CDC			1
GU-2006-08370	27-Oct-06	9	Grávida	1		1
GU-2006-08373	27-Oct-06	10	CDC			3
GU-2006-08377	27-Oct-06	10	Grávida	6		
GU-2006-08382	27-Oct-06	3	CDC			9
GU-2006-08383	27-Oct-06	3	CDC		1	
GU-2006-08390	27-Oct-06	4	Grávida	13		4
GU-2006-08391	27-Oct-06	4	Grávida		2	
GU-2006-08394	27-Oct-06	4	CDC			50
GU-2006-08395	27-Oct-06	4	CDC			32
GU-2006-08396	27-Oct-06	4	CDC		7	

B. Información de los iniciadores utilizados para la amplificación de *Flavivirus* y VON

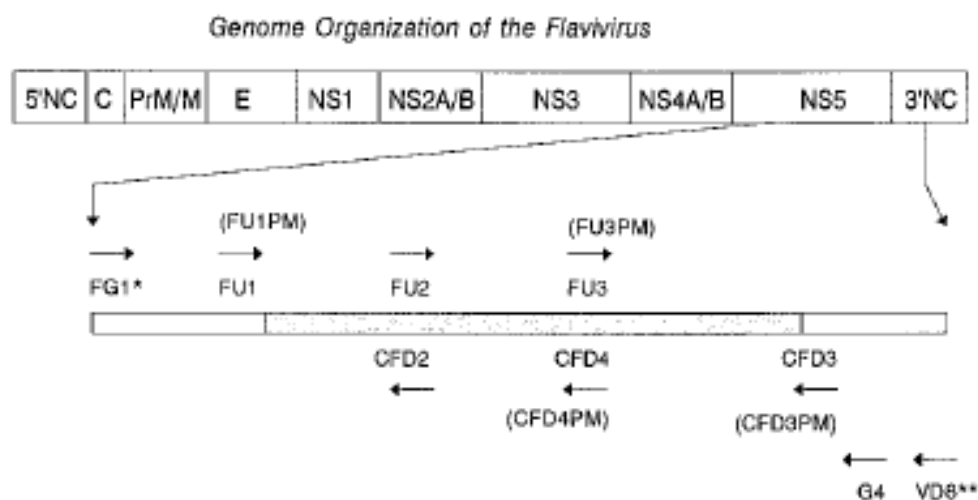
1. *Flavivirus*: Los iniciadores consensos para *Flavivirus*, FU2/cFD3 y FU1/cFD2, están diseñados para la amplificación de una porción de la proteína NS5, la cual codifica para la ARN polimerasa. Esta proteína se encuentra posicionada en el genoma del 7681 al 10395 nucleótidos en la cepa Mex03 y del 10399 al 11029 en la cepa NY99 y en otras cepas. Los iniciadores no son degenerados, ya que fueron diseñados para amplificar una secuencia conservada. La información de los iniciadores se encuentra en el Cuadro 6 y en la Figura 19.

Cuadro 6. Información de los iniciadores consensos utilizados para la amplificación de *Flavivirus*.

Nom.	Secuencia 5' → 3'	Posición en el genoma*	Longitud (nt)	Tamaño esperado de producto
FU2	GCTGATGACACCGCCGGCTGGGACAC	9233	26	850 pb
cFD3	AGCATGTCTTCCGTGGTCATCCA	10077	23	
FU1	TACAACATGATGGGAAAGAGAGAGAA	8993	26	250 pb
cFD2	GTGTCCCAGCCGGCGGTGTCATCAGC	9258	26	

*Posición relativa, depende del *Flavivirus*.

Figura 19. Organización del genoma de los *Flavivirus* y posición de los iniciadores en el genoma.



(Kuno, 1997)

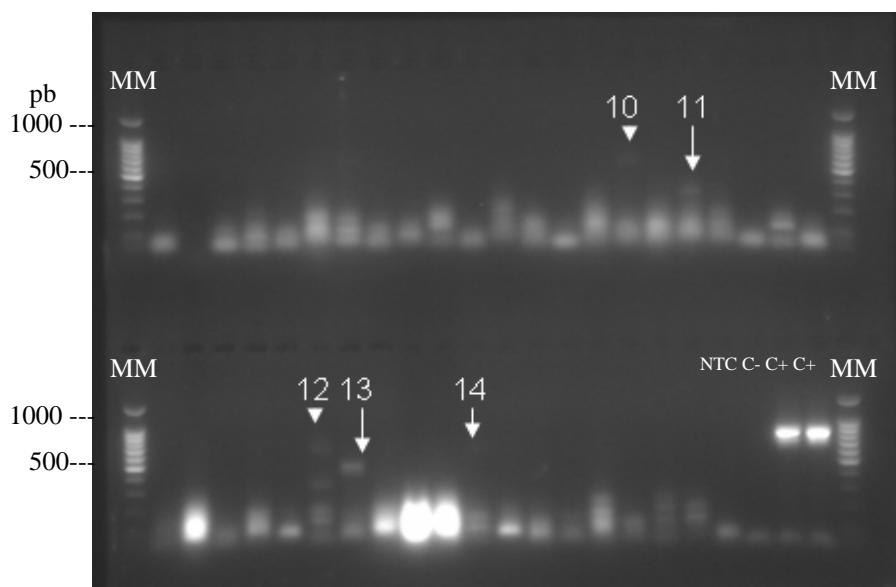
2. VON: Estos iniciadores están diseñados para la amplificación de una porción de la proteína NS5 del Virus del Oeste del Nilo. La información de estos iniciadores se encuentra en el cuadro siguiente.

Cuadro 7. Información de los iniciadores y la sonda utilizados para la amplificación de VON.

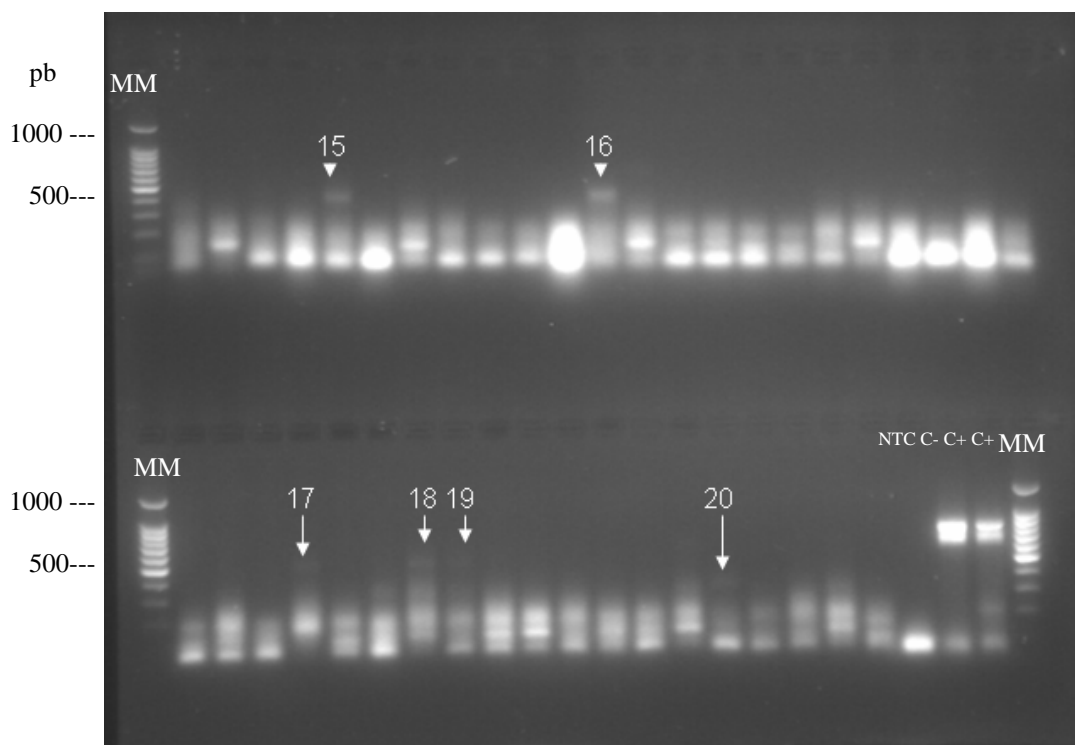
Nom.	Secuencia 5' → 3'	Posición en el genoma	Longitud (nt)	Tamaño esperado de producto
10668	CAGACCACGCTACGGCG	10668	17	103 pb
10770c	CTAGGGCCGCGTGGG	10770	15	
10691				
(sonda FAM)	TCTGCGGAGTGCAGTTCTGCGAT	10691	24	

C. Geles de agarosa de productos de amplificación e información de muestras positivas con la técnica molecular estandarizada

Figura 20. Tamizaje por RT-PCR para la detección de *Flavivirus* (2).



Se presenta la foto de uno de los geles analizados (Gel de agarosa 2 %, tinción con bromuro de etidio) con productos de amplificación de pools de *Culex quinquefasciatus* con los iniciadores FU2 y cFD3. MM: Marcador molecular 100 pb. Se indica con números del 10 – 14, los pools de *Culex quinquefasciatus* posibles positivos. NTC: Control negativo sin templado. C-: Control negativo con agua. C+: Control positivo 1:100.

Figura 21. Tamizaje por RT-PCR para la detección de *Flavivirus* (3).

Se presenta la foto de uno de los geles analizados (Gel de agarosa 2 %, tinción con bromuro de etidio) con productos de amplificación de pools de *Culex quinquefasciatus* con los iniciadores FU2 y cFD3.. MM: Marcador molecular 100 pb. Se indica con números del 15 – 20, los pools de *Culex quinquefasciatus* posibles positivos. NTC: Control negativo sin templado. C-: Control negativo con agua. C+: Control positivo 1:100.

En el Cuadro 8 se presenta información de las 20 que se identificaron como posibles positivos con la técnica estandarizada.

D. Resultados de los análisis estadísticos realizados en SAS 9.1

1. Análisis de la densidad relativa de *Culex quinquefasciatus*

a. Análisis de la densidad relativa por tipo de hábitat

```

Rural vrs Urbano
The GENMOD Procedure

Model Information

Data Set          WORK.ONE
Distribution      Poisson
Link Function     Log
Dependent Variable   Densidad
Offset Variable    Numtrampas
Observations Used  228
Densidad
Numtrampas

```

Cuadro 8. Información de los pools de zancudos positivos.

Numero de pool	Mes de colecta	Tipo de trampa	Tipo de hábitat
GU-2006-02692	Agosto	CDC	Urbano
GU-2006-02779	Agosto	CDC	Urbano
GU-2006-02810	Agosto	Grávida	Rural
GU-2006-02898	Septiembre	Grávida	Urbano
GU-2006-02933	Septiembre	CDC	Urbano
GU-2006-02941	Septiembre	CDC	Urbano
GU-2006-02945	Septiembre	Grávida	Urbano
GU-2006-02946	Septiembre	Grávida	Urbano
GU-2006-08246	Octubre	CDC	Urbano
GU-2006-08391	Octubre	Grávida	Urbano
GU-2006-08395	Octubre	CDC	Urbano
GU-2006-00895	Marzo	CDC	Urbano
GU-2006-00943	Marzo	CDC	Urbano
GU-2006-00951	Marzo	Grávida	Urbano
GU-2006-01009	Marzo	CDC	Urbano
GU-2006-01139	Abril	Grávida	Urbano
GU-2006-01228	Abril	Grávida	Urbano
GU-2006-01237	Abril	Grávida	Urbano
GU-2006-01243	Abril	Grávida	Urbano
GU-2006-01258	Abril	CDC	Rural

Class Level Information

Class	Levels	Values
Mes	8	1 2 3 4 5 6 7 8
Parameter	Information	
Parameter	Effect	Mes
Prm1	Intercept	
Prm2	Site	
Prm3	Mes	1
Prm4	Mes	2
Prm5	Mes	3
Prm6	Mes	4
Prm7	Mes	5
Prm8	Mes	6
Prm9	Mes	7
Prm10	Mes	8
Prm11	Site*Mes	1
Prm12	Site*Mes	2
Prm13	Site*Mes	3
Prm14	Site*Mes	4
Prm15	Site*Mes	5
Prm16	Site*Mes	6
Prm17	Site*Mes	7
Prm18	Site*Mes	8

Criteria For Assessing Goodness Of Fit

Criterion	DF	Value	Value/DF
Deviance	212	3902.5911	18.4084
Scaled Deviance	212	122.8455	0.5795
Pearson Chi-Square	212	6734.8791	31.7683
Scaled Pearson X2	212	212.0000	1.0000
Log Likelihood		63.5381	

Rural vrs Urbano
The GENMOD Procedure

Algorithm converged.

Analysis Of Parameter Estimates

Parameter	DF	Estimate	Standard Error	Wald	95% Confidence Limits	Chi-Square	Pr > Chi Sq
Intercept	1	1.1832	0.4815	0.2394	2.1271	6.04	0.0140
Sitio	1	-1.7585	1.1690	-4.0496	0.5327	2.26	0.1325
Mes 1	1	0.4439	0.5528	-0.6396	1.5274	0.64	0.4220
Mes 2	1	-0.0550	0.6488	-1.3267	1.2167	0.01	0.9324
Mes 3	1	-0.1683	0.7648	-1.6673	1.3306	0.05	0.8258
Mes 4	1	-0.1851	0.6414	-1.4422	1.0719	0.08	0.7728
Mes 5	1	-0.1908	0.7700	-1.7000	1.3183	0.06	0.8043
Mes 6	1	0.7163	0.6145	-0.4881	1.9207	1.36	0.2437
Mes 7	1	-0.0073	0.6823	-1.3445	1.3299	0.00	0.9914
Mes 8	0	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	.	.
Sitio*Mes1	1	0.8361	1.3271	-1.7649	3.4371	0.40	0.5287
Sitio*Mes2	1	-0.1979	1.7965	-3.7191	3.3233	0.01	0.9123
Sitio*Mes3	1	0.5545	1.8666	-3.1041	4.2130	0.09	0.7664
Sitio*Mes4	1	0.0323	1.7489	-3.3955	3.4601	0.00	0.9853
Sitio*Mes5	1	0.6823	1.8210	-2.8867	4.2513	0.14	0.7079
Sitio*Mes6	1	-0.9693	1.7844	-4.4667	2.5282	0.30	0.5870
Sitio*Mes7	1	0.4038	1.6799	-2.8886	3.6963	0.06	0.8100
Sitio*Mes8	0	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	.	.
Scale	0	5.6363	0.0000	5.6363	5.6363	.	.

NOTE: The scale parameter was estimated by the square root of Pearson's Chi-Square/DOF.

LR Statistics For Type 3 Analysis

Source	Num DF	Den DF	F Value	Pr > F	Chi-Square	Pr > Chi Sq
Sitio	1	212	18.22	<.0001	18.22	<.0001
Mes	7	212	0.68	0.6924	4.73	0.6928
Sitio*Mes	7	212	0.32	0.9430	2.26	0.9440

Contrast Estimate Results

Label	Estimate	Standard Error	Alpha	Confidence Limits	Chi-Square	Pr > Chi Sq
rural vs. urbano RR	-1.5907	0.4447	0.05	-2.4623 -0.7192	12.80	0.0003
Exp(rural vs. urbano RR)	0.2038	0.0906	0.05	0.0852 0.4871		

b. Análisis de la densidad relativa por tipo de trampa

CDC vrs Gravi da
The GENMOD Procedure

Model Information

Data Set	WORK.ONE
Distribution	Poisson
Link Function	Log
Dependent Variable	Densidad
Offset Variable	Numtrampas
Observations Used	228

Class Level Information

Class	Levels	Values
Mes	8	1 2 3 4 5 6 7 8

Parameter Information

Parameter	Effect	Mes
Prm1	Intercept	
Prm2	Mes	1
Prm3	Mes	2
Prm4	Mes	3
Prm5	Mes	4
Prm6	Mes	5
Prm7	Mes	6
Prm8	Mes	7
Prm9	Mes	8
Prm10	Ti po_Trampa	
Prm11	Ti po_Trampa*Mes	1
Prm12	Ti po_Trampa*Mes	2
Prm13	Ti po_Trampa*Mes	3
Prm14	Ti po_Trampa*Mes	4
Prm15	Ti po_Trampa*Mes	5
Prm16	Ti po_Trampa*Mes	6
Prm17	Ti po_Trampa*Mes	7
Prm18	Ti po_Trampa*Mes	8

Criteria For Assessing Goodness Of Fit

Criterion	DF	Value	Value/DF
Deviance	212	3965.3613	18.7045
Scaled Deviance	212	126.2670	0.5956
Pearson Chi-Square	212	6657.7711	31.4046
Scaled Pearson X2	212	212.0000	1.0000
Log Likelihood		63.2746	

CDC vrs Gravi da
The GENMOD Procedure

Algorithm converged.

Analysis Of Parameter Estimates

Parameter	DF	Estimate	Standard Error	Wald	95% Confidence Limits	Chi-Square	Pr > Chi Sq
Intercept	1	0.1061	0.7847	-1.4319	1.6441	0.02	0.8924
Mes	1	1.9406	0.8268	0.3201	3.5611	5.51	0.0189
Mes	2	1.1215	0.8966	-0.6357	2.8788	1.56	0.2110
Mes	3	0.4831	1.1210	-1.7140	2.6803	0.19	0.6665
Mes	4	0.4415	0.9746	-1.4687	2.3517	0.21	0.6506
Mes	5	1.1763	0.9676	-0.7202	3.0727	1.48	0.2241
Mes	6	1.1821	0.9183	-0.6178	2.9820	1.66	0.1980
Mes	7	0.7026	0.9994	-1.2561	2.6614	0.49	0.4820
Mes	8	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	.	.
Ti po_Trampa	1	0.8044	0.9441	-1.0460	2.6547	0.73	0.3942
Ti po_Trampa*Mes	1	-2.9479	1.1949	-5.2899	-0.6059	6.09	0.0136
Ti po_Trampa*Mes	2	-2.9266	1.6277	-6.1169	0.2637	3.23	0.0722
Ti po_Trampa*Mes	3	-0.6187	1.4368	-3.4348	2.1975	0.19	0.6668
Ti po_Trampa*Mes	4	-0.7033	1.2358	-3.1255	1.7189	0.32	0.5693
Ti po_Trampa*Mes	5	-3.0868	2.0862	-7.1756	1.0021	2.19	0.1390
Ti po_Trampa*Mes	6	-1.1365	1.1983	-3.4852	1.2122	0.90	0.3429
Ti po_Trampa*Mes	7	-0.8291	1.2910	-3.3595	1.7013	0.41	0.5208
Ti po_Trampa*Mes	8	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	.	.
Scale	0	5.6040	0.0000	5.6040	5.6040	.	.

NOTE: The scale parameter was estimated by the square root of Pearson's Chi-Square/DOF.

LR Statistics For Type 3 Analysis

Source	Num DF	Den DF	F Value	Pr > F	Chi-Square	Pr > Chi Sq
Mes	7	212	1.98	0.0593	13.85	0.0539
Ti po_Trampa	1	212	4.03	0.0461	4.03	0.0448
Ti po_Trampa*Mes	7	212	1.91	0.0697	13.35	0.0640

Contrast Estimate Results

Label	Estimate	Standard Error	Alpha	Confidence Limits	Chi-Square	Pr > Chi Sq
CDC vrs Gravi da RR	-0.7267	0.3908	0.05	-1.4928 0.0393	3.46	0.0630
Exp(CDC vrs Gravi da RR)	0.4835	0.1890	0.05	0.2247 1.0401		

C. Análisis de la densidad relativa según el tipo de trampa en cuadrantes urbanos

CDC vrs. Gravi da en Urbano por mes

The GENMOD Procedure

Model Information

Data Set	WORK.TWO
Distribution	Poisson
Link Function	Log
Dependent Variable	Densidad
Offset Variable	Numtrampas
Observations Used	130
Missing Values	5

Parameter Information

Parameter	Effect
Prm1	Intercept
Prm2	mes1
Prm3	mes2
Prm4	mes3
Prm5	mes4
Prm6	mes5
Prm7	mes6
Prm8	mes7
Prm9	Tipo_Trampa
Prm10	mes1*Tipo_Trampa
Prm11	mes2*Tipo_Trampa
Prm12	mes3*Tipo_Trampa
Prm13	mes4*Tipo_Trampa
Prm14	mes5*Tipo_Trampa
Prm15	mes6*Tipo_Trampa
Prm16	mes7*Tipo_Trampa

Criteria For Assessing Goodness Of Fit

Criterion	DF	Value	Value/DF
Deviance	114	2575.3414	22.5907
Scaled Deviance	114	84.1425	0.7381
Pearson Chi-Square	114	3489.1881	30.6069
Scaled Pearson X2	114	114.0000	1.0000
Log Likelihood		76.2072	

Algorithm converged.

CDC vrs. Gravi da en Urbano por mes

The GENMOD Procedure

Analysis Of Parameter Estimates

Parameter	DF	Estimate	Standard Error	Wald	95% Confidence Limits	Chi-Square	Pr > Chi Sq
Intercept	1	0.2886	1.0455	-1.7606	2.3378	0.08	0.7825
mes1	1	2.0813	1.0835	-0.0424	4.2050	3.69	0.0548
mes2	1	1.4327	1.1377	-0.7973	3.6626	1.59	0.2079
mes3	1	0.4750	1.4027	-2.2743	3.2242	0.11	0.7349
mes4	1	0.5572	1.2230	-1.8399	2.9543	0.21	0.6487
mes5	1	1.3263	1.2109	-1.0470	3.6997	1.20	0.2734
mes6	1	1.7318	1.1584	-0.5387	4.0023	2.23	0.1349
mes7	1	0.9853	1.2252	-1.4161	3.3867	0.65	0.4213
Tipo_Trampa	1	1.3591	1.1721	-0.9382	3.6565	1.34	0.2462
mes1*Tipo_Tr1		-3.6577	1.4256	-6.4519	-0.8636	6.58	0.0103
mes2*Tipo_Tr1		-3.6104	1.8677	-7.2710	0.0501	3.74	0.0532

mes3*Ti po_Tr1	-0.9072	1.6748	-4.1897	2.3753	0.29	0.5881
mes4*Ti po_Tr1	-1.0748	1.4421	-3.9012	1.7517	0.56	0.4561
mes5*Ti po_Tr1	-3.9741	2.6169	-9.1032	1.1550	2.31	0.1289
mes6*Ti po_Tr1	-1.6175	1.3946	-4.3508	1.1159	1.35	0.2461
mes7*Ti po_Tr1	-1.5658	1.5112	-4.5277	1.3962	1.07	0.3002
Scale	0	5.5324	0.0000	5.5324		

NOTE: The scale parameter was estimated by the square root of Pearson's Chi-Square/DOF.

LR Statistics For Type 3 Analysis

Source	Num DF	Den DF	F Value	Pr > F	Chi-Square	Pr > Chi Sq
mes1	1	114	6.66	0.0111	6.66	0.0099
mes2	1	114	2.12	0.1483	2.12	0.1456
mes3	1	114	0.12	0.7345	0.12	0.7338
mes4	1	114	0.22	0.6369	0.22	0.6360
mes5	1	114	1.41	0.2382	1.41	0.2357
mes6	1	114	2.97	0.0877	2.97	0.0850
mes7	1	114	0.73	0.3955	0.73	0.3938
Ti po_Trampa	1	114	1.67	0.1986	1.67	0.1960
mes1*Ti po_Trampa	1	114	8.76	0.0038	8.76	0.0031
mes2*Ti po_Trampa	1	114	5.50	0.0207	5.50	0.0190
mes3*Ti po_Trampa	1	114	0.30	0.5868	0.30	0.5857
mes4*Ti po_Trampa	1	114	0.60	0.4421	0.60	0.4405
mes5*Ti po_Trampa	1	114	4.22	0.0422	4.22	0.0399
mes6*Ti po_Trampa	1	114	1.53	0.2187	1.53	0.2161
mes7*Ti po_Trampa	1	114	1.18	0.2804	1.18	0.2782

CDC vrs. Gravi da en Urbano por mes

The GENMOD Procedure

Contrast Estimate Results

Label	Estimate	Standard Error	Alpha	Confidence Limits	Chi-Square
CDC vs. Gravi da RR, month 1	-2.2986	0.8115	0.05	-3.8890 -0.7082	8.02
Exp(CDCvs. Gravi da RR, month1)	0.1004	0.0815	0.05	0.0205 0.4925	
CDC vs. Gravi da RR, month 2	-2.2513	1.4541	0.05	-5.1012 0.5986	2.40
Exp(CDCvs. Gravi da RR, month2)	0.1053	0.1531	0.05	0.0061 1.8196	
CDC vs. Gravi da RR, month 3	0.4520	1.1962	0.05	-1.8926 2.7966	0.14
Exp(CDCvs. Gravi da RR, month3)	1.5714	1.8798	0.05	0.1507 16.3881	
CDC vs. Gravi da RR, month 4	0.2844	0.8401	0.05	-1.3622 1.9309	0.11
Exp(CDCvs. Gravi da RR, month4)	1.3289	1.1164	0.05	0.2561 6.8960	
CDC vs. Gravi da RR, month 5	-2.6150	2.3397	0.05	-7.2008 1.9709	1.25
Exp(CDCvs. Gravi da RR, month5)	0.0732	0.1712	0.05	0.0007 7.1768	
CDC vs. Gravi da RR, month 6	-0.2583	0.7557	0.05	-1.7394 1.2227	0.12
Exp(CDCvs. Gravi da RR, month6)	0.7724	0.5836	0.05	0.1756 3.3965	
CDC vs. Gravi da RR, month 7	-0.2066	0.9539	0.05	-2.0761 1.6629	0.05
Exp(CDCvs. Gravi da RR, month7)	0.8133	0.7758	0.05	0.1254 5.2747	
CDC vs. Gravi da RR, month 8	1.3591	1.1721	0.05	-0.9382 3.6565	1.34
Exp(CDCvs. Gravi da RR, month8)	3.8929	4.5630	0.05	0.3913 38.7250	

Contrast Estimate Results

Label	Pr > Chi Sq
CDC vs. Gravi da RR, month 1	0.0046
Exp(CDC vs. Gravi da RR, month 1)	
CDC vs. Gravi da RR, month 2	0.1216
Exp(CDC vs. Gravi da RR, month 2)	
CDC vs. Gravi da RR, month 3	0.7055
Exp(CDC vs. Gravi da RR, month 3)	
CDC vs. Gravi da RR, month 4	0.7350
Exp(CDC vs. Gravi da RR, month 4)	
CDC vs. Gravi da RR, month 5	0.2637
Exp(CDC vs. Gravi da RR, month 5)	
CDC vs. Gravi da RR, month 6	0.7325
Exp(CDC vs. Gravi da RR, month 6)	
CDC vs. Gravi da RR, month 7	0.8285
Exp(CDC vs. Gravi da RR, month 7)	
CDC vs. Gravi da RR, month 8	0.2462
Exp(CDC vs. Gravi da RR, month 8)	

CDC vrs Gravi da en Urbano

The GENMOD Procedure

Model Information

Data Set

WORK.TWO

Distribution Poisson
 Link Function Log
 Dependent Variable Densidad
 Offset Variable Numtrampas
 Observations Used 130
 Missing Values 5

Class Level Information

Class	Levels	Values
Mes	8	1 2 3 4 5 6 7 8

Parameter Information

Parameter	Effect	Mes
Prm1	Intercept	
Prm2	Mes	1
Prm3	Mes	2
Prm4	Mes	3
Prm5	Mes	4
Prm6	Mes	5
Prm7	Mes	6
Prm8	Mes	7
Prm9	Mes	8
Prm10	Tipo_Trampa	
Prm11	Tipo_Trampa*Mes	1
Prm12	Tipo_Trampa*Mes	2
Prm13	Tipo_Trampa*Mes	3
Prm14	Tipo_Trampa*Mes	4
Prm15	Tipo_Trampa*Mes	5
Prm16	Tipo_Trampa*Mes	6
Prm17	Tipo_Trampa*Mes	7
Prm18	Tipo_Trampa*Mes	8

Criteria For Assessing Goodness Of Fit

Criterion	DF	Value	Value/DF
Deviance	114	2575.3414	22.5907
Scaled Deviance	114	84.1425	0.7381
Pearson Chi-Square	114	3489.1881	30.6069
Scaled Pearson X2	114	114.0000	1.0000

CDC vrs Gravidan Urbano

The GENMOD Procedure

Criteria For Assessing Goodness Of Fit

Criterion	DF	Value	Value/DF
Log Likelihood		76.2072	

Algorithm converged.

Analysis Of Parameter Estimates

Parameter	DF	Estimate	Standard Error	Wald Chi-Square	95% Confidence Limits	Chi-Square	Pr > ChiSq
Intercept	1	0.2886	1.0455	-1.7606	2.3378	0.08	0.7825
Mes	1	2.0813	1.0835	-0.0424	4.2050	3.69	0.0548
Mes	2	1.4327	1.1377	-0.7973	3.6626	1.59	0.2079
Mes	3	0.4750	1.4027	-2.2743	3.2242	0.11	0.7349
Mes	4	0.5572	1.2230	-1.8399	2.9543	0.21	0.6487
Mes	5	1.3263	1.2109	-1.0470	3.6997	1.20	0.2734
Mes	6	1.7318	1.1584	-0.5387	4.0023	2.23	0.1349
Mes	7	0.9853	1.2252	-1.4161	3.3867	0.65	0.4213
Mes	8	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	.	.
Tipo_Trampa	1	1.3591	1.1721	-0.9382	3.6565	1.34	0.2462
Tipo_Trampa*Mes	1	-3.6577	1.4256	-6.4519	-0.8636	6.58	0.0103
Tipo_Trampa*Mes	2	-3.6104	1.8677	-7.2710	0.0501	3.74	0.0532
Tipo_Trampa*Mes	3	-0.9072	1.6748	-4.1897	2.3753	0.29	0.5881
Tipo_Trampa*Mes	4	-1.0748	1.4421	-3.9012	1.7517	0.56	0.4561
Tipo_Trampa*Mes	5	-3.9741	2.6169	-9.1032	1.1550	2.31	0.1289
Tipo_Trampa*Mes	6	-1.6175	1.3946	-4.3508	1.1159	1.35	0.2461
Tipo_Trampa*Mes	7	-1.5658	1.5112	-4.5277	1.3962	1.07	0.3002
Tipo_Trampa*Mes	8	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	.	.
Scale	0	5.5324	0.0000	5.5324	5.5324	.	.

NOTE: The scale parameter was estimated by the square root of Pearson's Chi-Square/DOF.

LR Statistics For Type 3 Analysis

Source	Num DF	Den DF	F Value	Pr > F	Chi - Square	Pr > Chi Sq
Mes	7	114	1.74	0.1060	12.20	0.0943
Ti po_Trampa	1	114	2.75	0.1001	2.75	0.0974
Ti po_Trampa*Mes	7	114	2.21	0.0388	15.44	0.0308

CDC vrs Gravi da en Urbano

The GENMOD Procedure

Contrast Estimate Results

Label	Estimate	Standard Error	Alpha	Confidence Limits	Chi - Square	Pr > Chi Sq
CDC vrs Gravi da RR	-0.6918	0.4548	0.05	-1.5832 0.1996	2.31	0.1283
Exp(CDCvrs. Gravi da RR)	0.5007	0.2277	0.05	0.2053 1.2210		

d. Análisis de la densidad relativa según el tipo de trampa en cuadrantes rurales

CDC vrs. Gravi da en rural por mes

The GENMOD Procedure
Model Information

Data Set	WORK.THREE
Distribution	Poisson
Link Function	Log
Dependent Variable	Densidad
Offset Variable	Numtrampas
Observations Used	98

Parameter Information

Parameter	Effect
Prm1	Intercept
Prm2	mes1
Prm3	mes2
Prm4	mes3
Prm5	mes4
Prm6	mes5
Prm7	mes6
Prm8	mes7
Prm9	Ti po_Trampa
Prm10	mes1*Ti po_Trampa
Prm11	mes2*Ti po_Trampa
Prm12	mes3*Ti po_Trampa
Prm13	mes4*Ti po_Trampa
Prm14	mes5*Ti po_Trampa
Prm15	mes6*Ti po_Trampa
Prm16	mes7*Ti po_Trampa

Criteria For Assessing Goodness Of Fit

Criterion	DF	Value	Value/DF
Deviance	82	547.0536	6.6714
Scaled Deviance	82	69.6364	0.8492
Pearson Chi-Square	82	644.1800	7.8559
Scaled Pearson X2	82	82.0000	1.0000
Log Likelihood		9.6906	

Algorithm converged.

CDC vrs. Gravi da en rural por mes

The GENMOD Procedure

Analysis Of Parameter Estimates

Parameter	DF	Estimate	Standard Error	Wald	95% Confidence Limits	Chi - Square	Pr > Chi Sq
Intercept	1	-0.0788	0.5844	-1.2243	1.0667	0.02	0.8928
mes1	1	1.3242	0.6588	0.0330	2.6154	4.04	0.0444
mes2	1	-0.2926	0.9302	-2.1158	1.5306	0.10	0.7531
mes3	1	0.3316	0.9501	-1.5306	2.1937	0.12	0.7271
mes4	1	-0.1103	0.8820	-1.8390	1.6185	0.02	0.9005
mes5	1	0.4651	0.9124	-1.3233	2.2534	0.26	0.6103
mes6	1	-0.2926	0.9302	-2.1158	1.5306	0.10	0.7531
mes7	1	-0.7190	1.2099	-3.0903	1.6524	0.35	0.5523
Ti po_Trampa	1	-1.5261	1.3830	-4.2367	1.1846	1.22	0.2698
mes1*Ti po_Tr1	1	-0.2775	1.6020	-3.4173	2.8623	0.03	0.8625
mes2*Ti po_Tr1	1	0.2043	2.0977	-3.9071	4.3158	0.01	0.9224
mes3*Ti po_Tr1	1	0.2733	2.1066	-3.8556	4.4022	0.02	0.8968
mes4*Ti po_Tr1	1	-0.2657	2.2289	-4.6342	4.1028	0.01	0.9051
mes5*Ti po_Tr1	1	0.1398	2.0899	-3.9564	4.2359	0.00	0.9467
mes6*Ti po_Tr1	1	0.2043	2.0977	-3.9071	4.3158	0.01	0.9224
mes7*Ti po_Tr1	1	2.5246	1.8570	-1.1151	6.1642	1.85	0.1740
Scale	0	2.8028	0.0000	2.8028	2.8028		

NOTE: The scale parameter was estimated by the square root of Pearson's Chi - Square/DOF.

LR Statistics For Type 3 Analysis

Source	Num DF	Den DF	F Value	Pr > F	Chi - Square	Pr > Chi Sq
mes1	1	82	4.96	0.0288	4.96	0.0260
mes2	1	82	0.10	0.7518	0.10	0.7510
mes3	1	82	0.12	0.7320	0.12	0.7311
mes4	1	82	0.02	0.9006	0.02	0.9003
mes5	1	82	0.25	0.6180	0.25	0.6166
mes6	1	82	0.10	0.7518	0.10	0.7510
mes7	1	82	0.40	0.5311	0.40	0.5293
Ti po_Trampa	1	82	1.60	0.2100	1.60	0.2064
mes1*Ti po_Trampa	1	82	0.03	0.8649	0.03	0.8645
mes2*Ti po_Trampa	1	82	0.01	0.9229	0.01	0.9226
mes3*Ti po_Trampa	1	82	0.02	0.8975	0.02	0.8971
mes4*Ti po_Trampa	1	82	0.01	0.9047	0.01	0.9045
mes5*Ti po_Trampa	1	82	0.00	0.9469	0.00	0.9468
mes6*Ti po_Trampa	1	82	0.01	0.9229	0.01	0.9226
mes7*Ti po_Trampa	1	82	2.24	0.1380	2.24	0.1342

CDC vrs. Gravi da en rural por mes

The GENMOD Procedure

Contrast Estimate Results

Label	Estimate	Standard Error	Al pha	Confi dence	Li mi ts	Chi - Square
CDC vs. Gravi da RR, month 1	-1.8036	0.8084	0.05	-3.3881	-0.2191	4.98
Exp(CDCvs. Gravi da RR, month1)	0.1647	0.1332	0.05	0.0338	0.8032	
CDC vs. Gravi da RR, month 2	-1.3218	1.5772	0.05	-4.4131	1.7696	0.70
Exp(CDCvs. Gravi da RR, month2)	0.2667	0.4206	0.05	0.0121	5.8684	
CDC vs. Gravi da RR, month 3	-1.2528	1.5891	0.05	-4.3673	1.8617	0.62
Exp(CDCvs. Gravi da RR, month3)	0.2857	0.4540	0.05	0.0127	6.4348	
CDC vs. Gravi da RR, month 4	-1.7918	1.7479	0.05	-5.2175	1.6340	1.05
Exp(CDCvs. Gravi da RR, month4)	0.1667	0.2913	0.05	0.0054	5.1244	
CDC vs. Gravi da RR, month 5	-1.3863	1.5668	0.05	-4.4572	1.6846	0.78
Exp(CDCvs. Gravi da RR, month5)	0.2500	0.3917	0.05	0.0116	5.3905	
CDC vs. Gravi da RR, month 6	-1.3218	1.5772	0.05	-4.4131	1.7696	0.70
Exp(CDCvs. Gravi da RR, month6)	0.2667	0.4206	0.05	0.0121	5.8684	
CDC vs. Gravi da RR, month 7	0.9985	1.2392	0.05	-1.4303	3.4274	0.65
Exp(CDCvs. Gravi da RR, month7)	2.7143	3.3637	0.05	0.2392	30.7967	
CDC vs. Gravi da RR, month 8	-1.5261	1.3830	0.05	-4.2367	1.1846	1.22
Exp(CDCvs. Gravi da RR, month8)	0.2174	0.3007	0.05	0.0145	3.2694	

Contrast Estimate Results

Label	Pr > Chi Sq
CDC vs. Gravi da RR, month 1	0.0257
Exp(CDC vs. Gravi da RR, month 1)	
CDC vs. Gravi da RR, month 2	0.4020
Exp(CDC vs. Gravi da RR, month 2)	
CDC vs. Gravi da RR, month 3	0.4305
Exp(CDC vs. Gravi da RR, month 3)	
CDC vs. Gravi da RR, month 4	0.3053
Exp(CDC vs. Gravi da RR, month 4)	
CDC vs. Gravi da RR, month 5	0.3763

Exp(CDC vs. Gravi da RR, month 5)	
CDC vs. Gravi da RR, month 6	0. 4020
Exp(CDC vs. Gravi da RR, month 6)	
CDC vs. Gravi da RR, month 7	0. 4204
Exp(CDC vs. Gravi da RR, month 7)	
CDC vs. Gravi da RR, month 8	0. 2698
Exp(CDC vs. Gravi da RR, month 8)	

CDC vrs Gravi da en Rural

The GENMOD Procedure

Model Information

Data Set	WORK. THREE	
Distribution	Poi sson	
Link Function	Log	
Dependent Variable	Densidad	Densidad
Offset Variable	Numtrampas	Numtrampas
Observations Used	98	

Class Level Information

Class	Level s	Val ues
Mes	8	1 2 3 4 5 6 7 8

Parameter Information

Parameter	Effect	Mes
Prm1	Intercept	
Prm2	Mes	1
Prm3	Mes	2
Prm4	Mes	3
Prm5	Mes	4
Prm6	Mes	5
Prm7	Mes	6
Prm8	Mes	7
Prm9	Mes	8
Prm10	Ti po_Trampa	
Prm11	Ti po_Trampa*Mes	1
Prm12	Ti po_Trampa*Mes	2
Prm13	Ti po_Trampa*Mes	3
Prm14	Ti po_Trampa*Mes	4
Prm15	Ti po_Trampa*Mes	5
Prm16	Ti po_Trampa*Mes	6
Prm17	Ti po_Trampa*Mes	7
Prm18	Ti po_Trampa*Mes	8

Cri teria For Assessing Goodness Of Fit

Cri terion	DF	Val ue	Val ue/DF
Devi ance	82	547. 0536	6. 6714
Scaled Devi ance	82	69. 6364	0. 8492
Pearson Chi -Square	82	644. 1800	7. 8559
Scaled Pearson X2	82	82. 0000	1. 0000
Log Li kel i hood		9. 6906	

CDC vrs Gravi da en Rural

The GENMOD Procedure

Algori thm converged.

Analysis Of Parameter Estimates

Parameter	DF	Estimate	Standard Error	Wal d	95% Confidence Limits	Chi - Square	Pr > Chi Sq
Intercept	1	-0. 0788	0. 5844	-1. 2243	1. 0667	0. 02	0. 8928
Mes	1	1. 3242	0. 6588	0. 0330	2. 6154	4. 04	0. 0444
Mes	2	-0. 2926	0. 9302	-2. 1158	1. 5306	0. 10	0. 7531
Mes	3	0. 3316	0. 9501	-1. 5306	2. 1937	0. 12	0. 7271
Mes	4	-0. 1103	0. 8820	-1. 8390	1. 6185	0. 02	0. 9005
Mes	5	0. 4651	0. 9124	-1. 3233	2. 2534	0. 26	0. 6103
Mes	6	-0. 2926	0. 9302	-2. 1158	1. 5306	0. 10	0. 7531
Mes	7	-0. 7190	1. 2099	-3. 0903	1. 6524	0. 35	0. 5523
Mes	8	0. 0000	0. 0000	0. 0000	0. 0000	.	.
Ti po_Trampa	1	-1. 5261	1. 3830	-4. 2367	1. 1846	1. 22	0. 2698
Ti po_Trampa*M1	1	-0. 2775	1. 6020	-3. 4173	2. 8623	0. 03	0. 8625

Ti po_Trampa*M2	1	0.2043	2.0977	-3.9071	4.3158	0.01	0.9224
Ti po_Trampa*M3	1	0.2733	2.1066	-3.8556	4.4022	0.02	0.8968
Ti po_Trampa*M4	1	-0.2657	2.2289	-4.6342	4.1028	0.01	0.9051
Ti po_Trampa*M5	1	0.1398	2.0899	-3.9564	4.2359	0.00	0.9467
Ti po_Trampa*M6	1	0.2043	2.0977	-3.9071	4.3158	0.01	0.9224
Ti po_Trampa*M7	1	2.5246	1.8570	-1.1151	6.1642	1.85	0.1740
Ti po_Trampa*M8	0	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	.	.
Scale	0	2.8028	0.0000	2.8028	2.8028	.	.

NOTE: The scale parameter was estimated by the square root of Pearson's Chi-Square/DOF.

LR Statistics For Type 3 Analysis

Source	Num DF	Den DF	F Value	Pr > F	Chi-Square	Pr > Chi Sq
Mes	7	82	1.72	0.1148	12.07	0.0984
Ti po_Trampa	1	82	6.09	0.0157	6.09	0.0136
Ti po_Trampa*Mes	7	82	0.65	0.7133	4.55	0.7147

Contrast Estimate Results

Label	Estimate	Standard Error	Alpha	Confidence Limits	Chi-Square	Pr > Chi Sq
CDC vrs Gravi da RR	-1.1757	0.5171	0.05	-2.1892 -0.1622	5.17	0.0230
Exp(CDCvrsGravi da RR)	0.3086	0.1596	0.05	0.1120 0.8503		

e. Correlación de la precipitación pluvial con la densidad relativa de *Culex quinquefasciatus* en cuadrantes urbanos

Asociación Precipitación pluvial - Densidad Urbano

The CORR Procedure

2 Variables: Ppl uvi al Densi dad

Simple Statistics

Vari able	N	Mean	Std Dev	Medi an	Mi ni mum	Maxi mum
Ppl uvi al	16	352.55000	214.69437	260.65000	104.60000	775.50000
Densi dad	16	0.95000	0.27340	0.90000	0.56000	1.39000

Spearman Correlation Coefficients, N = 16
Prob > |r| under H0: Rho=0

	Ppl uvi al	Densi dad
Ppl uvi al	1.00000	-0.06815 0.8020
Densi dad	-0.06815 0.8020	1.00000

f. Correlación de la precipitación pluvial con la densidad relativa de *Culex quinquefasciatus* en cuadrantes rurales

Asociación Precipitación pluvial - Densidad Rural

The CORR Procedure

2 Variables: Ppl uvi al Densi dad

Simple Statistics

Vari able	N	Mean	Std Dev	Medi an	Mi ni mum	Maxi mum
-----------	---	------	---------	---------	-----------	----------

Ppl uvi al	16	352.55000	214.69437	260.65000	104.60000	775.50000
Densi dad	16	0.90688	0.36412	0.92000	0.37000	1.55000

Spearman Correlation Coefficients, N = 16
Prob > |r| under H0: Rho=0

	Ppl uvi al	Densi dad
Ppl uvi al	1.00000	-0.26074 0.3294
Densi dad	-0.26074 0.3294	1.00000

2. Análisis comparativo de la tasa mínima de infección con *Flavivirus* en *Culex quinquefasciatus*

a. Comparación de la tasa mínima de infección con *Flavivirus* por tipo de trampa

MIR CDC-Gravida

The FREQ Procedure

Table of posneg by traptype

posneg	traptype		
	CDC	Gravida	Total
Frequency,			
Percent,			
Row Pct,			
Col Pct,			
N	555	1135	1690
	32.67	66.80	99.47
	32.84	67.16	
	99.46	99.47	
P	3	6	9
	0.18	0.35	0.53
	33.33	66.67	
	0.54	0.53	
Total	558	1141	1699
	32.84	67.16	100.00

Statistics for Table of posneg by traptype

Statistic	DF	Value	Prob
Chi-Square	1	0.0010	0.9749
Likelihood Ratio Chi-Square	1	0.0010	0.9750
Continuity Adj. Chi-Square	1	0.0000	1.0000
Mantel-Haenszel Chi-Square	1	0.0010	0.9749
Phi Coefficient		-0.0008	
Contingency Coefficient		0.0008	
Cramer's V		-0.0008	

WARNING: 25% of the cells have expected counts less than 5. Chi-Square may not be a valid test.

Fisher's Exact Test

Cell (1,1) Frequency (F)	555
Left-sided Pr <= F	0.6111
Right-sided Pr >= F	0.6626
Table Probability (P)	0.2737
Two-sided Pr <= P	1.0000

Sample Size = 1699

Mes 1 y 2 CDC-Gravida

The FREQ Procedure

Table of posneg by traptype

posneg	traptype		Total
Frequency,			
Percent ,			
Row Pct ,			
Col Pct ,	CDC	Gravi da	
N	558	1140	1698
	32.84	67.10	99.94
	32.86	67.14	
	100.00	99.91	
P	0	1	1
	0.00	0.06	0.06
	0.00	100.00	
	0.00	0.09	
Total	558	1141	1699
	32.84	67.16	100.00

Statistics for Table of posneg by traptype

Statistic	DF	Value	Prob
Chi-Square	1	0.4893	0.4842
Likelihood Ratio Chi-Square	1	0.7966	0.3721
Continuity Adj. Chi-Square	1	0.0000	1.0000
Mantel-Haenszel Chi-Square	1	0.4890	0.4844
Phi Coefficient		0.0170	
Contingency Coefficient		0.0170	
Cramer's V		0.0170	

WARNING: 50% of the cells have expected counts less than 5. Chi-Square may not be a valid test.

Fisher's Exact Test

Cell (1,1) Frequency (F)	558
Left-sided Pr <= F	1.0000
Right-sided Pr >= F	0.6716
Table Probability (P)	0.6716
Two-sided Pr <= P	1.0000

Sample Size = 1699

Mes 3 4 y 5 CDC-Gravi da

The FREQ Procedure

Table of posneg by traptype

posneg	traptype		Total
Frequency,			
Percent ,			
Row Pct ,			
Col Pct ,	CDC	Gravi da	
N	558	1141	1699
	32.84	67.16	100.00
	32.84	67.16	
	100.00	100.00	
Total	558	1141	1699
	32.84	67.16	100.00

Mes 7 CDC-Gravi da

The FREQ Procedure

Table of posneg by traptype

posneg	traptype		Total
Frequency,			
Percent ,			
Row Pct ,			
Col Pct ,	CDC	Gravi da	

N	557	1139	1696
	32.78	67.04	99.82
	32.84	67.16	
	99.82	99.82	
P	1	2	3
	0.06	0.12	0.18
	33.33	66.67	
	0.18	0.18	
Total	558	1141	1699
	32.84	67.16	100.00

Statistics for Table of posneg by traptype

Statistic	DF	Value	Prob
Chi-Square	1	0.0003	0.9856
Likelihood Ratio Chi-Square	1	0.0003	0.9856
Continuity Adj. Chi-Square	1	0.0000	1.0000
Mantel-Haenszel Chi-Square	1	0.0003	0.9856
Phi Coefficient		-0.0004	
Contingency Coefficient		0.0004	
Cramer's V		-0.0004	

WARNING: 50% of the cells have expected counts less than 5. Chi-Square may not be a valid test.

Fisher's Exact Test

Cell (1,1) Frequency (F)	557
Left-sided Pr <= F	0.6974
Right-sided Pr >= F	0.7474
Table Probability (P)	0.4448
Two-sided Pr <= P	1.0000

Sample Size = 1699

Mes 6 y 8 CDC-Gravida

The FREQ Procedure

Table of posneg by traptype

posneg	traptype		
	CDC	Gravida	Total
Frequency,			
Percent			
Row Pct			
Col Pct			
N	557	1140	1697
	32.78	67.10	99.88
	32.82	67.18	
	99.82	99.91	
P	1	1	2
	0.06	0.06	0.12
	50.00	50.00	
	0.18	0.09	
Total	558	1141	1699
	32.84	67.16	100.00

Statistics for Table of posneg by traptype

Statistic	DF	Value	Prob
Chi-Square	1	0.2672	0.6052
Likelihood Ratio Chi-Square	1	0.2509	0.6165
Continuity Adj. Chi-Square	1	0.0000	1.0000
Mantel-Haenszel Chi-Square	1	0.2671	0.6053
Phi Coefficient		-0.0125	
Contingency Coefficient		0.0125	
Cramer's V		-0.0125	

WARNING: 50% of the cells have expected counts less than 5. Chi-Square may not be a valid test.

Fisher's Exact Test

Cell (1,1) Frequency (F) 557
 Left-sided Pr <= F 0.5491
 Right-sided Pr >= F 0.8923
 Table Probability (P) 0.4414
 Two-sided Pr <= P 0.5491

Sample Size = 1699

b. Comparación de la tasa mínima de infección con *Flavivirus* por tipo de hábitat

MIR Urbano-Rural

The FREQ Procedure

Table of posneg by habitat

posneg	habit		
	Rural	Urbano	Total
Frequency,			
Percent ,			
Row Pct ,			
Col Pct ,			
N	249	1441	1690
	14.66	84.81	99.47
	14.73	85.27	
	99.60	99.45	
P	1	8	9
	0.06	0.47	0.53
	11.11	88.89	
	0.40	0.55	
Total	250	1449	1699
	14.71	85.29	100.00

Statistics for Table of posneg by habitat

Statistic	DF	Value	Prob
Chi-Square	1	0.0936	0.7596
Likelihood Ratio Chi-Square	1	0.1008	0.7508
Continuity Adj. Chi-Square	1	0.0000	1.0000
Mantel-Haenszel Chi-Square	1	0.0936	0.7597
Phi Coefficient		0.0074	
Contingency Coefficient		0.0074	
Cramer's V		0.0074	

WARNING: 25% of the cells have expected counts less than 5. Chi-Square may not be a valid test.

Fisher's Exact Test

Cell (1,1) Frequency (F) 249
 Left-sided Pr <= F 0.7622
 Right-sided Pr >= F 0.6092
 Table Probability (P) 0.3714
 Two-sided Pr <= P 1.0000

Sample Size = 1699

MIR Urbano-Rural Mes 1 y 2

The FREQ Procedure

Table of posneg by habitat

posneg	habit
Frequency,	
Percent ,	
Row Pct ,	

Col Pct	Rural	Urbano	Total
N	250	1448	1698
	14.71	85.23	99.94
	14.72	85.28	
	100.00	99.93	
P	0	1	1
	0.00	0.06	0.06
	0.00	100.00	
	0.00	0.07	
Total	250	1449	1699
	14.71	85.29	100.00

Statistics for Table of posneg by habitat

Statistic	DF	Value	Prob
Chi-Square	1	0.1726	0.6778
Likelihood Ratio Chi-Square	1	0.3184	0.5726
Continuity Adj. Chi-Square	1	0.0000	1.0000
Mantel-Haenszel Chi-Square	1	0.1725	0.6779
Phi Coefficient		0.0101	
Contingency Coefficient		0.0101	
Cramer's V		0.0101	

WARNING: 50% of the cells have expected counts less than 5. Chi-Square may not be a valid test.

Fisher's Exact Test

Cell (1,1) Frequency (F)	250
Left-sided Pr <= F	1.0000
Right-sided Pr >= F	0.8529
Table Probability (P)	0.8529
Two-sided Pr <= P	1.0000

Sample Size = 1699

MIR Urbano-Rural Mes 3, 4 y 5

The FREQ Procedure

Table of posneg by habitat

posneg	habit		
	Rural	Urbano	Total
Frequency,			
Percent			
Row Pct			
Col Pct			
N	250	1449	1699
	14.71	85.29	100.00
	14.71	85.29	
	100.00	100.00	
Total	250	1449	1699
	14.71	85.29	100.00

MIR Urbano-Rural Mes 7

The FREQ Procedure

Table of posneg by habitat

posneg	habit		
	Rural	Urbano	Total
Frequency,			
Percent			
Row Pct			
Col Pct			
N	249	1447	1696
	14.66	85.17	99.82
	14.68	85.32	
	99.60	99.86	
P	1	2	3
	0.06	0.12	0.18
	33.33	66.67	

		0.40	0.14	
Total	250	1449	1699	
	14.71	85.29	100.00	

Statistics for Table of posneg by habitat

Statistic	DF	Value	Prob
Chi-Square	1	0.8302	0.3622
Likelihood Ratio Chi-Square	1	0.6517	0.4195
Continuity Adj. Chi-Square	1	0.0091	0.9239
Mantel-Haenszel Chi-Square	1	0.8297	0.3624
Phi Coefficient		-0.0221	
Contingency Coefficient		0.0221	
Cramer's V		-0.0221	

WARNING: 50% of the cells have expected counts less than 5. Chi-Square may not be a valid test.

Fisher's Exact Test

Cell (1,1) Frequency (F)	249
Left-sided Pr <= F	0.3799
Right-sided Pr >= F	0.9416
Table Probability (P)	0.3214
Two-sided Pr <= P	0.3799

Sample Size = 1699

MIR Urbano-Rural Mes 6 y 8

The FREQ Procedure

Table of posneg by habitat

posneg	habitat		
	Rural	Urbano	Total
Frequency,			
Percent,			
Row Pct,			
Col Pct			
N	250	1447	1697
	14.71	85.17	99.88
	14.73	85.27	
	100.00	99.86	
P	0	2	2
	0.00	0.12	0.12
	0.00	100.00	
	0.00	0.14	
Total	250	1449	1699
	14.71	85.29	100.00

Statistics for Table of posneg by habitat

Statistic	DF	Value	Prob
Chi-Square	1	0.3455	0.5567
Likelihood Ratio Chi-Square	1	0.6371	0.4248
Continuity Adj. Chi-Square	1	0.0000	1.0000
Mantel-Haenszel Chi-Square	1	0.3453	0.5568
Phi Coefficient		0.0143	
Contingency Coefficient		0.0143	
Cramer's V		0.0143	

WARNING: 50% of the cells have expected counts less than 5. Chi-Square may not be a valid test.

Fisher's Exact Test

Cell (1,1) Frequency (F)	250
Left-sided Pr <= F	1.0000
Right-sided Pr >= F	0.7273
Table Probability (P)	0.7273
Two-sided Pr <= P	1.0000

Sample Size = 1699

3. Correlación del mes de captura con la tasa mínima de infección con *Flavivirus*

Asociación Mes - MIR en Urbano The CORR Procedure

2 Variables: Mes Mir

Simple Statistics

Variable	N	Mean	Std Dev	Median	Minimum	Maximum
Mes	8	4.50000	2.44949	4.50000	1.00000	8.00000
Mir	8	0.69013	0.63894	0.69013	0	1.38026

Spearman Correlation Coefficients, N = 8
Prob > |r| under H0: Rho=0

	Mes	Mir
Mes	1.00000	0.56695 0.1428
Mir	0.56695 0.1428	1.00000

Asociación Mes - MIR en Rural The CORR Procedure

2 Variables: Mes Mir

Simple Statistics

Variable	N	Mean	Std Dev	Median	Minimum	Maximum
Mes	8	4.50000	2.44949	4.50000	1.00000	8.00000
Mir	8	0.50000	1.41421	0	0	4.00000

Spearman Correlation Coefficients, N = 8
Prob > |r| under H0: Rho=0

	Mes	Mir
Mes	1.00000	0.41239 0.3100
Mir	0.41239 0.3100	1.00000

Asociación Mes - MIR en CDC

The CORR Procedure

2 Variables: Mes Mir

Simple Statistics

Variable	N	Mean	Std Dev	Median	Minimum	Maximum
Mes	8	4.50000	2.44949	4.50000	1.00000	8.00000
Mir	8	0.67204	0.92751	0	0	1.79211

Spearman Correlation Coefficients, N = 8
Prob > |r| under H0: Rho=0

	Mes	Mir
Mes	1.00000	0.84515 0.0082
Mir	0.84515 0.0082	1.00000

Asociación Mes - MIR en Gravi da

The CORR Procedure

2 Variables: Mes Mir

Simple Statistics						
Variable	N	Mean	Std Dev	Median	Minimum	Maximum
Mes	8	4.50000	2.44949	4.50000	1.00000	8.00000
Mir	8	0.65732	0.61973	0.87642	0	1.75285

Spearman Correlation Coefficients, N = 8
Prob > |r| under H0: Rho=0

	Mes	Mir
Mes	1.00000	0.29994 0.4704
Mir	0.29994 0.4704	1.00000

4. Correlación de la densidad relativa de *Culex quinquefasciatus* con la tasa mínima de infección con *Flavivirus*

a. En cuadrantes rurales

Asociación Densidad-MIR Rural

The CORR Procedure

2 Variables: Densidad Mir

Simple Statistics						
Variable	N	Mean	Std Dev	Median	Minimum	Maximum
Densidad	16	0.90688	0.36412	0.92000	0.37000	1.55000
Mir	16	0.05478	0.21911	0	0	0.87642

Spearman Correlation Coefficients, N = 16
Prob > |r| under H0: Rho=0

	Densidad	Mir
Densidad	1.00000	0.14023 0.6045
Mir	0.14023 0.6045	1.00000

b. En cuadrantes urbanos

Asociación Densidad-MIR Urbano

The CORR Procedure

2 Variables: Densidad Mir

Simple Statistics						
Variable	N	Mean	Std Dev	Median	Minimum	Maximum
Densidad	16	0.95000	0.27340	0.90000	0.56000	1.39000
Mir	16	0.60990	0.70823	0.43821	0	1.79211

Spearman Correlation Coefficients, N = 16
 Prob > |r| under H0: Rho=0

	Densi dad	Mi r
Densi dad	1. 00000	0. 29065 0. 2748
Mi r	0. 29065 0. 2748	1. 00000

E. Información del clima en Puerto Barrios en los meses de estudio

Cuadro 9. Información del clima de Puerto Barrios en los meses de estudio.

Variable	Dimensional	Mar	Abr	May	Jun	Jul	Ago	Sep	Oct
T. Media	° C	25.5	26.9	27.9	27.6	27.7	27.8	27.9	27.4
T. max. Promed.	° C	29.9	30.8	31.6	30.6	31.2	31.3	31.4	30.7
T. min. Promed.	° C	20.7	22.1	23.5	23.6	23.9	23.7	23.7	23.6
Humedad Relativa prom	%	78.0	78.0	76.0	83.0	83.0	82.0	81.0	83.0
Lluvia	MM	218.8	224.0	104.6	775.5	428.8	297.3	212.7	558.7
Lluvia	Días	18.0	8.0	12.0	25.0	25.0	23.0	21.0	19.0
Nubosidad	Octas	3.0	5.0	6.0	8.0	8.0	8.0	7.0	8.0
Viento	Km/h	9.0	8.0	15.0	6.3	7.6	7.0	6.9	6.2
Dirección viento	Km/h	0.0	360.0	360.0	0.0	6.0	0.0	36.0	0.0
Insolación	Horas	7.6	8.5	7.3	4.4	5.6	6.3	7.6	6.1
Presión	MM	759.4	757.8	757.3	757.6	758.7	757.9	757.7	757.2

(INSIVUMEH, 2006)