

**UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA**

Facultad de Ciencias y Humanidades



Preferencias de alimentación sanguínea de zancudos *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) en un foco de transmisión de Virus del Oeste del Nilo, Puerto Barrios, Izabal

Trabajo de investigación presentado por

Ana Silvia González Reiche

para optar al grado de Licenciado en Bioquímica y Microbiología

Guatemala

2008

**BIBLIOTECA**  
UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA



Preferencias de alimentación sanguínea de zancudos *Culex*  
*quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) en un foco de transmisión de  
Virus del Oeste del Nilo, Puerto Barrios, Izabal

**UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA**

Facultad de Ciencias y Humanidades

Preferencias de alimentación sanguínea de zancudos *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) en un foco de transmisión de Virus del Oeste del Nilo, Puerto Barrios, Izabal

Trabajo de investigación presentado por


Ana Silvia González Reiche

para optar al grado de Licenciado en Bioquímica y Microbiología

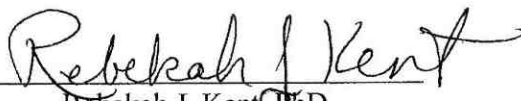
Guatemala


2008

VoBo.

f)   
\_\_\_\_\_  
María Eugenia Morales-Betoulle, PhD  
Asesor Principal

Tribunal Examinador

f)   
\_\_\_\_\_  
Rebekah J. Kent, PhD  
Asesora

f)   
\_\_\_\_\_  
Pamela Pennington, PhD  
Tribunal Examinador

Fecha de aprobación: Guatemala, 17 de septiembre de 2008

## PREFACIO

Este estudio fue financiado parcialmente por fondos otorgados a Rebekah J. Kent, PhD (Robert E. Shope International Fellowship 2007, Sociedad Americana de Higiene y Medicina Tropical), en colaboración con el Dr. Nicholas Komar Sc D. de la División de Enfermedades Infecciosas Transmitidas por Vectores de los Centros para el Control y Prevención de Enfermedades de Fort Collins, EE.UU. (DVBID-CDC) y el Centro de Estudios en Salud de la Universidad del Valle de Guatemala, (CES-UVG). Este estudio también recibió financiamiento del Acuerdo Cooperativo # U50/CCU021236-01 entre la UVG y el CDC.

Un agradecimiento muy especial a mis asesoras M.E. Morales-Betoulle, PhD y R.J. Kent, por sus enseñanzas, orientación, consejos y ejemplo como personas e investigadoras, por creer en mí y darme la oportunidad de realizar este trabajo. Un sincero agradecimiento a todas las personas que colaboraron con este estudio: Equipo del proyecto de vigilancia ecológica del virus del Oeste del Nilo (C. Cordón-Rosales, M.E. Morales-Betoulle, D. Álvarez, M.R. López, C. Paiz, S. Sosa, M.L. Müller, C.L. Contreras, M.L. Monzón, B. Molina, S. Recinos, C. Chaluleu, J-L. Betoulle, R. Medrano, A. Salam, M. Santiago, A. Alvarado), N. Komar y N. Panella (DVBID-CDC) por la orientación en las actividades de campo; N. Komar por su apoyo durante mi entrenamiento en el laboratorio con la Dra R.J. Kent; A. Estévez (EINA-CDC-UVG) por el material y apoyo prestado en el laboratorio; C. Paiz por su ayuda en el procesamiento de muestras; a G. Young y B.W. Johnson (DVBID-CDC) por los análisis de secuenciación, pruebas moleculares y ensayos de aislamiento viral. A S. Recinos, por su asistencia en el manejo de bases de datos y obtención de datos. A la Dra. P. Pennington, por su apoyo como directora del departamento de Bioquímica y Microbiología.

Finalmente, un expreso agradecimiento a mis padres y hermanos por siempre ser una motivación y ayudarme a concluir esta carrera y también por su cariño incondicional, y a H. y M. Centeno por su ejemplo y por todo el apoyo brindado a lo largo de mis estudios universitarios.

## ÍNDICE

PREFACIO .....	iv
ÍNDICE.....	vi
LISTA DE CUADROS.....	vii
LISTA DE FIGURAS.....	viii
RESUMEN .....	ix
ABSTRACT.....	x
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. MARCO METODÓLOGICO.....	25
III. RESULTADOS .....	35
IV. DISCUSIÓN .....	45
V. CONCLUSIONES.....	56
VI. RECOMENDACIONES.....	57
VII. LITERATURA CITADA .....	58
VIII. APÉNDICE.....	68

## LISTA DE CUADROS

Cuadro	Página
Cuadro 1. Flavivirus que causan enfermedad en humanos.....	2
Cuadro 2. Secuencia de cebadores especie-específicos basados en el gen citocromo b.....	31
Cuadro 3. Número y porcentaje de ingestas sanguíneas por especie identificadas de <i>Cx. quinquefasciatus</i> colectados en los cuadrantes urbanos del estudio de Foco de Transmisión, Puerto Barrios, Izabal, durante 2007 .....	37
Cuadro 4. Índices de alimentación para <i>Cx. quinquefasciatus</i> entre especies de vertebrados. ....	41
Cuadro 5. Resultados de los ensayos de RT-PCR a partir ARN de pools de zancudos <i>Culex quinquefasciatus</i> alimentados, colectados durante 2007, en Puerto Barrios, Izabal .....	43

## LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
Figura 1. Estructura y expresión del genoma de flavivirus .....	4
Figura 2. Ciclo de transmisión del VON .....	11
Figura 3. Pasos requeridos para infección y transmisión por un artrópodo.....	12
Figura 4. Sitio de estudio, Puerto Barrios, Izabal .....	26
Figura 5. Optimización de pruebas de PCR ND4.....	35
Figura 6. PCR ND4 para verificación de calidad de ADN .....	36
Figura 7. Optimización de pruebas de PCR para identificación de hospederos.....	37
Figura 8. Densidad relativa de <i>Culex quinquefasciatus</i> , y número de ingestas sanguíneas identificadas obtenidas a partir de hospederos aviares y mamíferos en Puerto Barrios, Izabal, durante 2007. ....	39
Figura 9. Proporción de ingestas sanguíneas de <i>Cx. quinquefasciatus</i> obtenidas de hospederos mamíferos y aviares en Puerto Barrios, Izabal, durante 2007 .....	39
Figura 10. Proporción de ingestas sanguíneas de <i>Cx. quinquefasciatus</i> obtenidas de hospederos mamíferos y aviares en los hábitats urbano y peri-urbano, en Puerto Barrios, Izabal, en 2007.....	40
Figura 11. Productos de RT-PCR obtenidos con cebadores concenso para flavivirus a partir de ARN de pools de zancudos <i>Culex quinquefasciatus</i> alimentados, colectados durante 2007, en Puerto Barrios, Izabal.....	42
Figura 12. Relación entre la proporción de ingestas sanguíneas de <i>Cx. quinquefasciatus</i> obtenidas de gallinas, densidad de zancudos e incidencia de VON en gallinas.....	44
Figura 13. Algoritmo de identificación de las ingestas sanguíneas de <i>Cx. quinquefasciatus</i> alimentados colectados en Puerto Barrios durante 2007 .....	105

## RESUMEN

A través del estudio de los hábitos de alimentación es posible identificar aquellas especies de vectores potencialmente involucrados en la amplificación y transmisión enzoótica y endémica de virus transmitidos por artrópodos hematófagos como el virus del Oeste del Nilo (VON). En este trabajo de tesis se estudiaron las preferencias de alimentación sanguínea de la especie de zancudos *Culex quinquefasciatus* dentro del marco de la vigilancia del virus del Oeste del Nilo en un foco de transmisión activa en el municipio de Puerto Barrios, departamento de Izabal.

Se realizó un estudio retrospectivo con zancudos capturados durante el año 2007 para observar sus preferencias alimenticias en un ambiente doméstico del área urbana. La identificación de la ingesta sanguínea se llevó a cabo por medio de técnicas moleculares para la detección de ADN mitocondrial. Para esto se utilizó la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), con cebadores específicos para orden y especie de aves y mamíferos, para la detección del gen del *citocromo b*. Los resultados de la identificación de ingesta sanguínea fueron analizados en conjunto con los datos disponibles de encuestas de población de humanos y animales domésticos del sitio de estudio para obtener la razón de alimentación. Se observó variación significativa en los patrones de alimentación de tipo estacional (estación seca y húmeda) y por tipo de hábitat.

Así mismo, se hicieron pruebas para la detección molecular de flavivirus y virus del Oeste del Nilo en los zancudos alimentados. Se detectó la presencia del flavivirus de insectos CxFV Izabal 2006 en dos pools de zancudos alimentados, MLE =  $0.52 \cdot 1000$  zancudos. Las tasa de infección por VON en zancudos *Cx. quinquefasciatus*, para el año 2007 fue 2.11 y  $2.65 \cdot 1000$  zancudos para los mes de julio y agosto respectivamente. Se observó que existe una correlación positiva entre la incidencia mensual de VON en gallinas centinela y la densidad de *Culex quinquefasciatus* a lo largo del año, relacionado con un alto porcentaje de ingestas sanguíneas derivadas a partir de gallinas.

## ABSTRACT

The study of haematophagous arthropod's feeding behavior is useful for the identification of vector species potentially involved in the enzootic and endemic transmission of vector borne diseases, such as West Nile virus (WNV). In this study, host feeding patterns of *Culex quinquefasciatus* mosquitoes in the domestic environment of a WNV transmission focus in Guatemala, were assessed.

Engorged mosquitoes collected in the urban area of Puerto Barrios municipality during year 2007 were analyzed. From all collected mosquitoes, around 11% (n=428) had a detectable blood meal. Mammal and avian host identification was carried out using a Polymerase Chain Reaction (PCR) assay with order and species specific primers for the amplification of mitochondrial cytochrome b gene. PCR results were analyzed using the local human and animal population data to determine host feeding preferences. Ninety percent of identified blood meals were derived from avian hosts, including domestic and wild birds, and only 10% were derived from mammal host, principally dogs. These results suggest that *Cx. quinquefasciatus* mosquitoes have an ornithophilic behavior in this locality.

Additionally, mosquitoes were tested for the presence of flavivirus and WNV RNA by RT-PCR and TaqMan RT-PCR assay respectively. RNA from CxFV Izabal 2006 was detected in two pools of engorged mosquitoes, infection rate (MLE) =  $0.52 \times 1000$  female mosquitoes. West Nile virus MLE estimated for year 2007 in *Cx. quinquefasciatus*, was 2.11 and  $2.65 \times 1000$  female mosquitoes in July and August respectively. A positive relationship between the total number of chicken-derived blood meals, monthly incidence of WNV in sentinel chickens and mosquito density was observed. Therefore, a role for young chicks as amplifying hosts of WNV, spread by *Cx. quinquefasciatus* in this locality is hypothesized.

# I. INTRODUCCIÓN

Los flavivirus (virus de ARN de hebra positiva) se caracterizan en su mayoría por causar enfermedad en hospederos vertebrados. La mayor parte de estos virus pueden ser transmitidos por vectores artrópodos hematófagos. En Guatemala se ha reportado la presencia de varios flavivirus, siendo el principal el virus Dengue, considerado endémico y causante de numerosas epidemias en los últimos años (OPS 2008). Al final de los años 50 se reportó el aislamiento de virus de Fiebre Amarilla a partir de zancudos capturados en el valle del Motagua (Jorge y Bevier 1958). También se reportó la presencia del virus Jutiapa en roedores (Karabastros 1985) y recientemente, investigadores del Centro de Estudios en Salud de la Universidad del Valle en conjunto con el Centro para el Control y Prevención de Enfermedades para Centro América y Panamá (CES-UVG/CDC-CAP) y la División de Enfermedades Infecciosas Transmitidas por Vectores de los Centros para el Control y Prevención de Enfermedades de Fort Collins, USA, han demostrado la presencia del virus del Oeste del Nilo (VON) y de un flavivirus de insectos en Guatemala (M.E. Morales-Betoulle, datos no publicados). De estos virus, el virus del Oeste del Nilo (VON), es transmitido por zancudos principalmente del género *Culex*, y se mantiene en un ciclo enzoótico entre los hospederos reservorios que son principalmente aves silvestres. Sin embargo, algunos zancudos con diversas preferencias de alimentación de hospederos vertebrados pueden transmitir el virus y causar enfermedad en humanos. Respecto a este virus, considerado emergente en el país, no se sabe si tendrá repercusiones para la salud humana y animal.

Este trabajo se desarrolló como parte del estudio de vigilancia ecológica del VON, en el CES-UVG y su principal objetivo fue el estudio de las preferencias de alimentación sanguínea de una especie de zancudo, en una zona de transmisión activa del VON, con el fin de determinar si ésta puede ser vector del virus entre hospederos aviares y mamíferos como el humano. Se espera que los resultados obtenidos ayuden a comprender la relación entre los potenciales vectores y hospederos de esta localidad, y provean información para el desarrollo de medidas de control y prevención enfocadas a reducir el esparcimiento del virus hacia otras áreas del país.

## A. Antecedentes

1. **Flavivirus.** La familia *Flaviviridae* es una familia de virus de ARN de hebra positiva. Esta familia consiste de tres géneros, los *Pestivirus*, *Hepacivirus* y *Flavivirus*. El género *flavivirus* contienen la mayor parte de las especies pertenecientes a la familia *Flaviviridae* (Lindenbach y Rice 2001). Según la clasificación internacional más reciente el género flavivirus incluye 53 especies de virus de las cuales 27 son transmitidas por zancudos, 12 por garrapatas y 14 son agentes zoonóticos sin vector conocido (VNC) (Gubler, Kuno y Markoff 2007). Además de esta clasificación, es conocido que existen otros flavivirus de insectos, que forman un grupo separado genéticamente y que están presentes en varias regiones geográficas (Morales-Betoulle *et al.* 2008). De manera general, los flavivirus están asociados a altos niveles de morbilidad y mortalidad en hospederos vertebrados alrededor del mundo. Veintidós (65%) de los virus transmitidos por zancudos, 13 (76%) transmitidos por garrapatas y 5 (23%) virus de VNC pueden causar enfermedad en humanos (Cuadro 1) (Gubler, Kuno y Markoff 2007).

Cuadro 1. Flavivirus que causan enfermedad en humanos

<b>Virus</b>	<b>Vector</b>	<b>Enfermedad</b>
Dengue	Zancudos <i>Aedes</i>	Sistémica suave, fiebre, fiebre hemorrágica, síndrome de choque de dengue
Fiebre amarilla	Zancudos <i>Aedes</i>	Hepatitis, fiebre hemorrágica
Virus del Oeste del Nilo	Zancudos <i>Culex</i>	Fiebre, encefalitis, hepatitis
Encefalitis de St. Louis	Zancudos <i>Culex</i>	Encefalitis
Encefalitis Venezolana	Equina Zancudos <i>Culex</i>	Encefalitis
Hepatitis C	Ninguno	Hepatitis

(Tomado y modificado de Flint *et al.* 2004)

Usualmente los miembros del género flavivirus han sido clasificados por medio de ensayos serológicos (neutralización). De acuerdo a la reactividad cruzada resultante de estos ensayos, se ha agrupados a los flavivirus en ocho complejos antigénicos (Calisher *et al.* 1989). Dos de estos grupos lo conforman los flavivirus transmitidos por zancudos, cada uno de estos grupos se distingue por la sintomatología

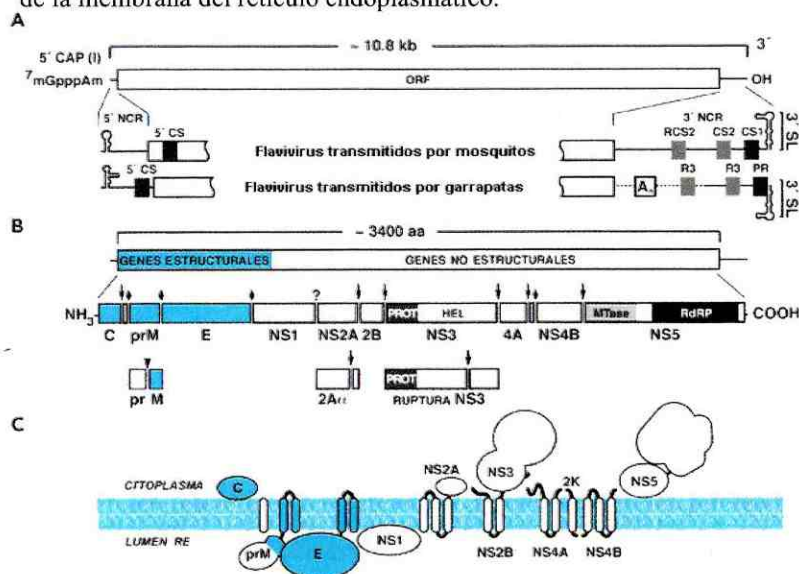
clínica que provoca en humanos y por su ecología. Los flavivirus que causan encefalitis, se encuentran en el serogrupo de Encefalitis Japonesa e incluyen al virus de encefalitis japonesa (VEJ), virus del Oeste del Nilo (VON), virus de encefalitis del Valle de Murray (VEVM), virus de la encefalitis de Saint Louis (VESL) y al virus Kunjin (Kuno *et al.* 1998; Calisher *et al.* 1989). Todos estos virus son zoonóticos, sus hospederos vertebrados naturales son aves y sus principales vectores son zancudos del género *Culex*. El otro grupo incluye virus vicerotrópicos que pueden causar fiebres hemorrágicas como el virus de la fiebre amarilla (VFA) y el virus dengue (DEN). Estos virus tienen un ciclo silvestre que involucra primates inferiores como hospederos vertebrados y zancudos del género *Aedes* como vectores principales (Gubler *et al.* 2007; Hoshino *et al.* 2006). Las propiedades antigénicas que distinguen a estos grupos y los síntomas que estos virus provocan, están relacionadas con su composición y estructura tanto física como molecular, estas dos importantes características se describen a continuación.

a. Morfología y genoma de los flavivirus. Las partículas virales de flavivirus tienen apariencia esférica, poseen un diámetro de 40 a 60 nm, con un centro denso en electrones (alrededor de 30 nm de diámetro). Las partículas están rodeadas por una bicapa de lípidos derivada de la célula hospedera que contiene dos glicoproteínas integrales de membrana de naturaleza viral: la proteína de envoltura E (53 kDa) y la proteína de membrana prM (18-20 kDa) (Petersen y Roehrig 2001). La cápside, formada por la proteína C, encierra un genoma de ARN de simple hebra de polaridad positiva, típicamente de 11 kilobases (kb) de largo (Chambers *et al.* 1990; Lindenbach, Thiel y Rice 2007). El ARN posee un único marco abierto de lectura (ORF por sus siglas en inglés) de aproximadamente 10 kb que codifica una poli-proteína de 3386 a 3433 aminoácidos (Figura 1). En los extremos 5' y 3' de la ORF se encuentran regiones no codificantes o no traducidas (UTR por sus siglas en inglés) (McMinn 1997).

En la fase de maduración del virus la proteína M es generada por el corte porteolítico de la proteína prM. Este corte es realizado por una proteasa celular y la proteína M es incorporada al virión maduro (Petersen y Roehrig 2001). La glicoproteína E es la proteína estructural mayoritaria en la superficie de la partícula viral, probablemente interactúa con los receptores virales, y está involucrada en la fusión de las membranas del virus y la célula, estimula la producción de anticuerpos neutralizantes, se ha observado que las mutaciones en esta proteína pueden afectar la virulencia (Lindenbach y Rice 2001). Además de las proteínas estructurales, el

genoma codifica siete proteínas no estructurales (NS1, NS2a, NS2a, NS3, NS4a, NS4b y NS5) involucradas en la replicación viral (Petersen y Roehrig 2001). NS1 es una glicoproteína asociada a la membrana que tiene un papel importante pero poco conocido en la replicación del virus (Lindenbach *et al.* 2007). NS3 es la segunda proteína viral más grande; posiblemente trifuncional, con actividades proteasa, helicasa y ARN trifosfatasa. La región N-terminal de NS3 contiene una fuerte homología con proteasas de serina y se piensa que funciona en el rompimiento de la poliproteína en asociación con la proteína NS2B; la región C-terminal de NS3 tiene homología con una familia de helicinas de ARN. La proteína NS5 es la proteína más grande y más conservada de los *flavivirus*, se piensa que actúa como una ARN polimerasa viral, posee un motivo GDD en común con las ARN polimerasas dependientes de ARN de virus de ARN de hebra positiva. La región N-terminal de NS5 presenta homología con motivos proteicos de varias metiltransferasas y se ha sugerido que este dominio está relacionado con la metilación del extremo 5'. NS2A, NS2B, NS4A y NS4B son proteínas asociadas a membrana pobremente conservadas, para las cuales no se ha establecido una función clara; se cree que estas proteínas pueden ser necesarias para la localización y actividad del complejo de polimerasa (McMinn 1997). Todas estas proteínas están involucradas en el ciclo de replicación de los flavivirus que se detalla en la siguiente sección.

Figura 1. Estructura y expresión del genoma de flavivirus. A) Estructura genómica y elementos de ARN. B) procesamiento de poliproteínas y productos del rompimiento. Topología propuesta para los productos poliproteicos de rompimiento de flavivirus con respecto de la membrana del retículo endoplasmático.



(Lindenbach *et al.* 2007)

b. **Ciclo de replicación.** Para entrar en las células de un hospedero, un virus debe ser reconocido a través de un sistema de receptores celulares que interactúan con las proteínas virales. En el caso de los flavivirus la principal proteína reconocida es la glicoproteína E descrita en la sección anterior. Luego de esta etapa de reconocimiento, el virus entra en las células por endocitosis. Después de un cambio conformacional de la proteína E, dependiente del pH, las membranas viral y endosomal se fusionan, liberando la nucleocápside en el citoplasma. Se cree que en ese momento, el virus se replica en las membranas asociadas al retículo endoplasmático para generar hebras negativas de ARN. Este ARN (-) se utiliza como plantilla para la síntesis de ARN (+). La hebra de ARN (+) puede ser empacada o bien utilizada para la traducción de proteínas virales adicionales. Finalmente, el virus se ensambla y emerge dentro del retículo endoplasmático para formar partículas virales inmaduras que contienen la proteína prM. Luego de las modificaciones en el aparato de Golgi y el corte de la proteína prM se generan los viriones maduros e infecciosos que son liberados por exocitosis (Samuel y Diamond 2006).

Dentro de los flavivirus, se encuentra el virus del Oeste del Nilo, emergente en el continente americano. A continuación se presenta una descripción general de este virus, su ciclo de transmisión y estrategias utilizadas para su vigilancia y control.

2. **Virus del Oeste del Nilo.** El virus del Oeste del Nilo (VON), se aisló por primera vez en 1937 de una paciente nativa de Uganda con síntomas febriles (Gubler *et al.* 2007). Luego de esto, entre los años 50 y 70 se reportaron desde casos aislados hasta brotes mayores de la fiebre del Oeste del Nilo en África, Medio Oriente, Europa y Asia. Estos reportes incluyen epidemias de menos de 1000 casos en su mayoría en poblaciones rurales. Sin embargo, a principios de la década de 1990, se presentó un mayor número de brotes, especialmente en el área del Mediterráneo con más casos de enfermedad severa incluyendo encefalitis y síntomas neurológicos (Kramer, Styer y Ebel 2008; Dauphin *et al.* 2004; Hubálek y Halouzka 1999). Luego del apareamiento de un brote en Nueva York en 1999 (CDC 1999; Lanciotti *et al.* 1999; Nash *et al.* 2001) este flavivirus transmitido por zancudos es ahora el arbovirus con la más amplia distribución geográfica (Kramer *et al.* 2008), y por lo tanto considerado un patógeno emergente o resurgente de importancia mundial (Gubler 2002).

Los análisis filogenéticos de la secuencia de nucleótidos de un gran número de genomas completos han demostrado la existencia de dos linajes genéticos principales del VON (Berthet *et al.* 1997; Lanciotti *et al.* 2002). Sin embargo, recientemente Bondre y colaboradores (2007), tras la comparación de secuencias parciales y completas de aislados virales de India, han propuesto la existencia de 5 linajes genéticos diferentes. El linaje 1 comprende aislados de varias partes de África, el Medio Oriente, Europa, Australia y el Hemisferio Occidental y ha sido asociado a las mayores epidemias del virus. Los virus de linaje 2 han sido aislados de África y Madagascar y son mantenidos principalmente en ciclos enzoóticos. El linaje 3 está conformado por el aislado de Austria conocido como virus de Rabensburg (Bakonyi *et al.* 2005). Los aislados de Rusia representan el linaje 4 y 13 aislados de India forman el quinto linaje (Bondre *et al.* 2007).

El linaje I está compuesto por diversos sublinajes con heterogeneidad considerable en cuanto al carácter antigénico y secuencia de nucleótidos (Gubler *et al.* 2007; Berthet *et al.* 1997, Lanciotti *et al.* 2002). Los datos de la secuencia de nucleótidos, sugieren que el virus introducido a Nueva York pertenece al linaje I originario del Medio Oriente (Lanciotti *et al.* 1999). Aunque no se sabe con exactitud como ha evolucionado el virus en el continente americano, se han observado cambios genéticos en los virus aislados en 2003 en Texas y México. Estudios recientes sugieren que estos cambios han tenido como resultado una disminución en las propiedades neuroinvasivas del VON (Gubler *et al.* 2007). Según Hayes y colaboradores, a medida que se extiende el rango geográfico de distribución de VON y se obtienen más aislados virales (y sus secuencias genéticas), se muestra que los virus presentan modificaciones genéticas ligadas a distintos patrones de neuroinvasividad y neurovirulencia (Hayes *et al.* 2005b).

Durante los últimos años el VON se ha esparcido a la mayor parte del territorio de los Estados Unidos y Canadá (CDC 2007a). En América Latina se ha reportado evidencia de circulación de VON (esencialmente serológica) en caballos y aves de Guadalupe, México, El Salvador, Jamaica, República Dominicana, Puerto Rico, islas Caimán, Cuba, Colombia, Trinidad y Argentina (Komar y Clark 2006; Dupuis *et al.* 2005; Kramer *et al.* 2008). Aún así, se ha observado poca evidencia de morbilidad y

mortalidad en humanos y equinos. Una hipótesis establece que la virulencia del VON se habría reducido en las regiones tropicales debido a la protección cruzada provocada por la presencia de otros flavivirus que circulan en estas regiones (Kramer *et al.* 2008). Según estos mismos autores, otra posibilidad para explicar que hay tasas menores de morbilidad en humanos de Europa del norte respecto al sur, es que los zancudos vectores tengan preferencias alimenticias diferentes en regiones geográficas diferentes. En Guatemala, en el año 2004, se reportó evidencia de transmisión de VON en caballos sanos seropositivos en varios departamentos del país (Morales-Betoulle *et al.* 2006). En investigaciones posteriores, realizadas entre septiembre de 2004 y marzo de 2006, se encontró caballos, ganado, perros y aves residentes silvestres y domésticas seropositivas para VON (Morales-Betoulle *et al.* 2007). Como parte de estas investigaciones se han realizado estudios para identificar las especies de zancudos vectores de VON en el país. Una de las dificultades para dichos estudios es que en Guatemala, existen en varios departamentos, más de 130 especies de zancudos con altas densidades (Darsie 1994; Clark-Gil y Darsie 1983). Otra dificultad es la presencia de otros flavivirus en la región, como el virus de Encefalitis de Saint Louis o el Dengue, que se cree podrían generar diagnósticos confusos (Komar y Clark 2006).

Luego de un importante esfuerzo de captura y caracterización de zancudos, en 2007, se detectó la presencia del VON en las especies *Culex quinquefasciatus*, *Cx. nigripalpus* y *Cx. mollis-inflictus*; del departamento de Izabal (M.E. Morales-Betoulle, datos no publicados). Sin embargo, aún no se conoce con exactitud el papel que cada una de estas especies pueda tener en la transmisión del virus.

De forma simultánea a los estudios ecológicos, investigadores del CES-UVG/CDC-CAP han realizado esfuerzos de investigación en varios hospitales del país (E. Dueger *et al.* datos no publicados) A la fecha, en estos estudios no se ha reportado casos humanos con enfermedad neurológica atribuible a VON. Esta situación contrasta con lo descrito en otros países, en particular Estados Unidos en donde el virus representa un problema de salud pública debido a las manifestaciones que causa.

a. Patogénesis, sintomatología, diagnóstico, tratamiento y vacunas. Se cree que el VON se replica en el sitio de inoculación y luego se esparce a los ganglios linfáticos por el torrente sanguíneo. El VON infecta directamente las neuronas, en particular en el núcleo de la materia gris, el tronco cerebral y la espina dorsal (Samuel y Diamond 2006).

La mayoría de infecciones por el VON son asintomáticas (~80%), y aproximadamente 20 a 30 % de los individuos infectados desarrollan manifestaciones clínicas relacionadas con cuadros febriles caracterizados por fiebres altas, dolor de cabeza, fatiga, malestar, dolor muscular y debilidad; también se han reportado síntomas gastrointestinales, y eczema en tronco y extremidades (Hayes *et al.* 2005b). Un menor número de individuos (1%), puede desarrollar enfermedad neuroinvasiva. En dichos casos las características clínicas en general incluyen cefalea severa, síntomas oculares, debilidad muscular, daño cognitivo, temblores, meningitis y parálisis flácida. La tasa de mortalidad ligada a la infección neuroinvasiva es de aproximadamente el 10% y las secuelas neurológicas a largo plazo son comunes (Samuel y Diamond 2006). Además de las manifestaciones neurológicas otros síntomas que pueden ocurrir durante la infección por VON incluyen hepatitis, pancreatitis, miocarditis, orquitis y coriorretinitis. El riesgo de encefalitis aumenta con la edad y es mayor en pacientes con trasplante de órganos. La severidad de la enfermedad varía desde una ligera desorientación hasta un coma y la muerte (Hayes *et al.* 2005b).

El diagnóstico de laboratorio generalmente se lleva a cabo a través de pruebas serológicas principalmente Ensayos de Inmuno-adsorbencia Ligado a Enzima (ELISA por sus siglas en inglés). Debido a las relaciones antigénicas de los virus del complejo JE, se necesitan pruebas especializadas para diferenciarlos (Petersen y Roehrig 2001). En la actualidad, las técnicas moleculares son importantes para el estudio específico de enfermedades infecciosas emergentes y re-emergentes debidas a estos tipos de virus (Holmes 1998).

En pacientes con un cuadro sospechoso de una infección por VON, se busca la presencia de anticuerpos IgM e IgG hacia VON por ELISA en suero o líquido cefalorraquídeo (Granwehr *et al.* 2004). Las muestras positivas de ELISA deben ser confirmadas por la prueba de neutralización y reducción en placa (PRNT). Los ensayos de ELISA, permiten analizar gran cantidad de muestras, pero no son tan sensibles como el aislamiento de virus en cultivo de tejido o algunas pruebas moleculares (Lanciotti 2003). En los humanos, la carga viral generalmente es

muy baja para ser detectada por aislamiento viral o por amplificación de ácidos nucleicos a menos que se trate de una muestra de tejido de un caso fatal (Gubler *et al.* 2007). Sin embargo, el aislamiento viral constituye un diagnóstico sin ambigüedades y se puede realizar a partir de cultivo celular de suero, LCR o tejidos, con la posterior detección del virus (Campbell *et al.* 2002).

Con o sin diagnóstico definitivo, el tratamiento es principalmente sintomático de soporte. Los pacientes con síntomas severos meníngeos usualmente requieren tratamiento para el control de cefaleas, terapia antiemética y rehidratación. Algunos compuestos como ribarvirina, interferon- $\alpha$ , inmunoglobulinas específicas para VON son considerados tratamientos específicos para la enfermedad (Hayes *et al.* 2005b). Sin embargo, hasta el momento ninguna intervención terapéutica ha demostrado ser consistentemente eficaz contra las infecciones flavivirales (Gubler *et al.* 2007). Actualmente existen cuatro vacunas con licencia contra el VON para caballos, y aunque no existe ninguna vacuna humana, cuatro se encuentran en pruebas clínicas para ser aprobadas (Kramer *et al.* 2008). El virus de la vacuna viva atenuada de la fiebre amarilla 17D, se ha utilizado como base para crear una vacuna quimérica que contiene los genes de las proteínas prM y E del VON y los genes de las proteínas no estructurales del virus 17D (Granwehr *et al.* 2004). Esta vacuna conocida como ChimeraVax-WNV se encuentra en fase II. Otra posible vacuna es el uso de un plásmido recombinante derivado del virus de sarampión con una porción que codifica para la glicoproteína E de las cepas altamente virulentas del VON (Brandler y Tangy 2008). Las otras dos opciones son, una vacuna quimérica contra el dengue y el VON, y una vacuna inactivada, ambas se encuentran en la fase I de ensayos clínicos (Kramer *et al.* 2008).

Junto con las investigaciones enfocadas al desarrollo de tratamientos más específicos para el VON, se han desarrollado programas de control y vigilancia con el objetivo de minimizar la incidencia de enfermedad en humanos. Estos esfuerzos se enfocan en el monitoreo de diversos factores ecológicos relacionados con las diferentes etapas del ciclo de transmisión.

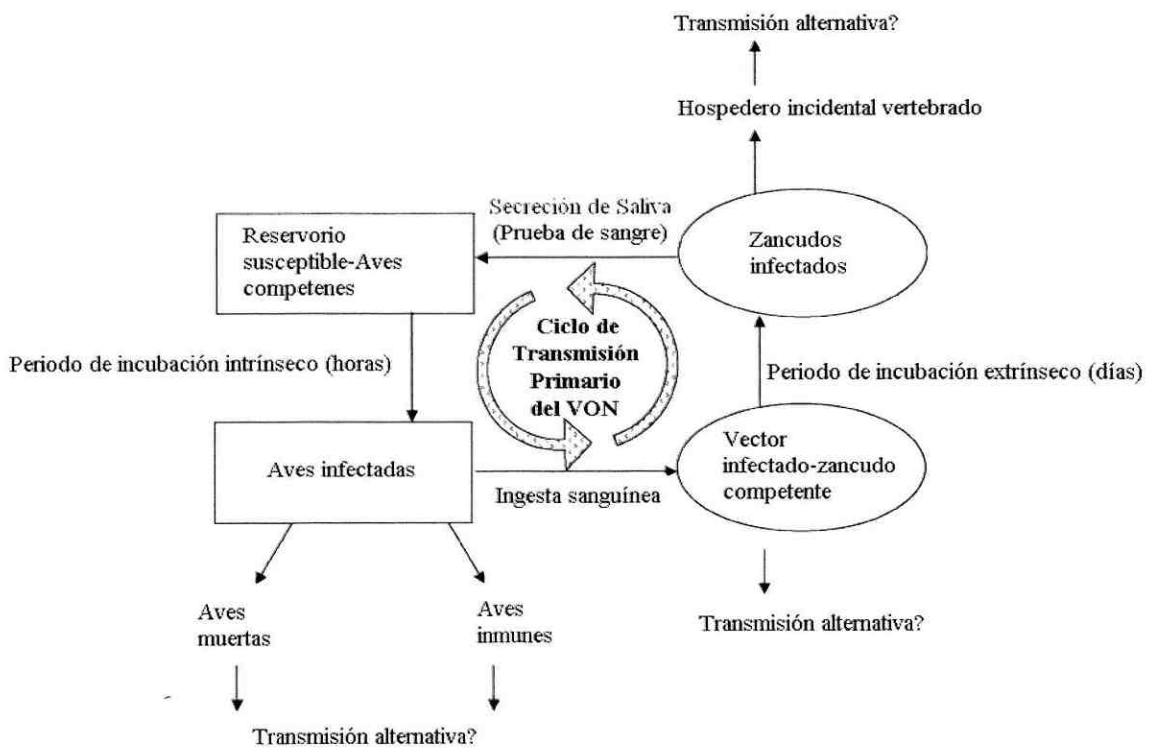
b. Ciclo de transmisión del virus del Oeste del Nilo. Como se indicó anteriormente los flavivirus transmitidos por vectores se dividen en dos grupos filogenéticos, derivados de *Aedes*- y *Culex*- con base a las diferencias de los dos vectores principales (Hoshino *et al.* 2006). En el Asia, particularmente en Japón varias especies del género *Culex* son importantes vectores de JEV y vectores potenciales de otros *flavivirus*, como el VON (Mackenzie *et al.* 2004).

La transmisión biológica tanto del VON como de cualquier flavivirus transmitido por zancudos incluye tres componentes esenciales: virus, vector y hospedero vertebrado (Kuno y Chang 2005). El hospedero vertebrado principal del VON son las aves, el virus se mantiene en la naturaleza en un ciclo de transmisión entre zancudo-ave-zancudo que involucra principalmente los zancudos del género *Culex* (Campbell *et al.* 2002). El ciclo primario de transmisión (Figura 2) involucra a los reservorios competentes (aves) que pueden transmitir el virus a los zancudos que se alimentan de ellas durante un periodo relativamente breve de viremia elevada que sigue a la infección (Komar 2003). Los zancudos se infectan cuando ingieren virus con la ingesta de sangre. Luego de la ingestión, el virus infecta las células del estómago, dispersándose hacia la hemolinfa y luego a una variedad de tejidos, incluyendo las glándulas salivales. Una vez la infección haya llegado a las glándulas salivales, el zancudo es capaz de transmitir el virus a través del fluido salival a otro vertebrado hospedero cuando se alimente de su sangre (Figura 3). El periodo de tiempo desde que el zancudo es infectado, hasta que las glándulas salivales se infectan y el virus puede ser transmitido se conoce como “periodo de incubación extrínseco”. Este periodo dura de 8 a 14 días, dependiendo de la temperatura ambiente y de la cepa de virus y zancudo. Otros hospederos vertebrados como humanos y otros mamíferos son hospederos incidentales y generalmente no están involucrados en el ciclo de transmisión hasta que el virus es introducido en un ambiente peri-doméstico (Gubler *et al.* 2007).

Como se muestra en la Figura 2 existen varias rutas alternativas de transmisión. En los zancudos, se han demostrado dos: La primera, es la transmisión de un zancudo infectado a su descendencia (transmisión vertical) y la segunda es la transmisión entre zancudos que se alimentan de un mismo hospedero infectado antes de que éste desarrolle viremia clásica, subsecuente a la replicación en el tejido blanco. Este tipo de transmisión se conoce como transmisión horizontal o transmisión no virémica (TNV) (Kuno y Chang 2005; Hartemink *et al.* 2007). La TNV es el resultado de una transmisión rápida y directa de un artrópodo donador infectado a un artrópodo receptor no infectado. Esto elimina la necesidad de un periodo intrínseco de incubación, lo cual puede aumentar el rango de hospederos vertebrados (McGee *et al.* 2007). Por otro lado, la transmisión vertical parece ser un factor determinante en la persistencia del virus en las regiones templadas del norte, en donde las especies de vectores que hibernan, permiten la sobrevivencia del virus, amplificándolo durante la primavera o bien transmitiéndolo horizontalmente a otros vectores (Anderson y Main 2006). Otras formas alternativas de transmisión potencial del VON incluyen el contacto directo entre hospederos vertebrados en la

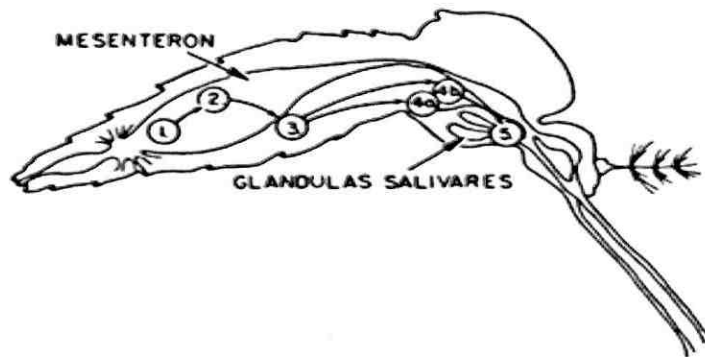
ausencia de vectores artrópodos. Este modo incluye la transmisión por aerosoles, por sangre, oral, feco-oral y sexual (Komar 2003). En humanos, se han reportado casos de transmisión viral intrauterina, por transfusión sanguínea, por lactancia, por trasplante de órganos y por trabajo en el laboratorio (Granwehr *et al.* 2004; Hayes *et al.* 2005a). Independientemente del mecanismo de transmisión de VON, los factores ambientales y biológicos tales como barreras ecogeográficas, vertebrados disponibles, etc.; así como los ciclos biológicos deben estar sincronizados para asegurar el contacto entre el vector y los hospederos (Gubler *et al.* 2007).

Figura 2. Ciclo de transmisión del VON. Las especies de vectores pueden variar pero los zancudos culicinos son los responsables de los ciclos de amplificación. Las aves silvestres son los hospederos virémicos más importantes para la mayoría de los virus. También se muestran posibles rutas de transmisión alternativas.



(Tomado y modificado de Komar 2003)

Figura 3. Pasos requeridos para infección y transmisión por un artrópodo: (1) Que la ingesta sanguínea contenga el virus y que (2) éste infecte las células epiteliales que recubren el mesenterón. (3) El escape del virus desde el epitelio del estómago hacia la hemolinfa; (4) la infección de las glándulas salivales con o sin una amplificación secundaria en otros tejidos o células y (5) La secreción del virus en la saliva durante la siguiente ingesta de un hospedero vertebrado susceptible.



(Burke y Monath 2001; Gubler et al. 2007).

1) Hospederos. En general, los flavivirus transmitidos por zancudos han expandido tanto su rango de hospederos como su diversidad debido a que la tasa de mutación del genoma de ARN es menor en comparación a otros virus de ARN. Esto les permitiría mantener una replicación efectiva en los distintos ambientes tanto del hospedero vertebrado como del vector artrópodo (Burke y Monath 2001).

El VON tiene un rango de hospederos y vectores excepcionalmente amplio (Komar 2003). La introducción del VON a Norte América es un ejemplo de cómo el rango de hospederos puede expandirse grandemente por la introducción de un virus a una nueva región geográfica con un amplio espectro de nuevos hospederos. El virus ha sido aislado de más de 300 especies de aves representantes de 14 órdenes; ciertas especies de aves en el hemisferio occidental desarrollan enfermedad neurológica fatal (Gubler *et al.* 2007). Es generalmente aceptado que los movimientos locales de aves residentes, no migratorias así como los viajes largos de las aves migratorias podrían contribuir al esparcimiento del VON (Hayes *et al.* 2005a; Rappole, Derrickson y Hubálek 2000; Rappole y Hubálek 2003). Se ha demostrado mediante estudios de laboratorio que algunas especies del orden Passeriformes (pájaros cantores), Charadriiformes (playeros), Strigiformes (búhos) y Falconiformes (halcones) desarrollan viremias lo suficientemente altas para infectar un zancudo dentro de un periodo de unos pocos días, mientras que otras especies de los ordenes Columbiformes (palomas), Piciformes (carpinteros) y Anseriformes (patos) no. Entre las passerinas se encuentra el gorrión mexicano *Carpodacus mexicanus*, el gorrión inglés (*Passer domesticus*) altamente susceptibles a las infecciones por VON (Hayes *et al.* 2005a). Sin embargo se ha descrito también en estudios de laboratorio la transmisión directa entre aves ya sea por

contacto directo o por medio de ingesta de cadáveres de aves infectadas (Komar 2003; Hayes *et al.* 2005a). En la naturaleza parece que el contacto cercano entre cuervos, es importante en el establecimiento del VON especialmente cuando las densidades de mosquitos ornitofílicos disminuyen o cuando la densidad de cuervos aumenta (Hartemink *et al.* 2007).

Los hospederos vertebrados incidentales no producen viremia significativa y no contribuyen al ciclo de transmisión. Se han documentado casos de enfermedad y/o muerte provocada por VON en más de 30 especies no aviares, incluyendo humanos, equinos, felinos, caninos, ungulados, roedores, murciélagos, mamíferos del mar y lagartos (Komar 2003). Los reptiles desarrollan viremias de larga duración y podrían ser potenciales hospederos amplificadores (Dauphin *et al.* 2004). Aún no se conoce con exactitud el papel que juegan los hospederos vertebrados no aviares en la transmisión y persistencia del VON (Gubler *et al.* 2007).

2) Vectores. Aunque las especies del género *Culex* han sido identificadas como vectores principales, comparado con la mayoría de arbovirus, el VON ha sido aislado de un rango excepcionalmente amplio de especies de zancudos (Granwehr *et al.* 2004). En Estados Unidos, durante el periodo entre 1999 y 2006, el virus ha sido encontrado en 62 especies diferentes de zancudos (CDC 2007b) incluyendo especies de los géneros *Aedes*, *Anopheles*, *Coquilletidia*, *Culiseta*, *Deinocerites*, *Mansonia*, *Orthopodomyia*, *Psorophora* y *Uranotaenia*. Aislar un virus de una especie en particular de zancudos, no necesariamente implica que esta especie sea capaz de replicarlo y transportarlo a las glándulas salivales vía a hemolinfa y por la tanto ser un vector competente. Los miembros del género *Culex* parecen ser los más eficientes en esparcir el virus entre aves y de aves a humanos y otros mamíferos (Dauphin *et al.* 2004). En Europa y África los vectores primarios son *Culex pipiens*, *Cx. univittatus*, *Cx. antennatus*, en India, especies del complejo *Cx. vishnui* y *Cx. tritaeniorhynchus* en el sur de Asia. En Australia el virus Kunjin (equivalente de VON) es transmitido principalmente por *Cx. annulirostris* (Hayes *et al.* 2005a; Komar 2003).

En Estados Unidos (Kilpatrick *et al.* 2005) y Europa (Hubalek y Halouza 1999), la especie altamente ornitofílica, *Cx. pipiens*, conocida como el zancudo doméstico del norte, es abundante en áreas urbanas y ha sido identificada como uno de los principales vectores epizooticos del VON entre aves (Campbell *et al.* 2002). El complejo *Cx. pipiens*, el cual incluye *Cx. quinquefasciatus* está ampliamente distribuido. En Norte América este grupo está representado por tres miembros principales: el zancudo doméstico del norte, *Cx. pipiens* en áreas por encima de una latitud de 39° N., el zancudo doméstico del sur, *Cx. quinquefasciatus* que se encuentra en latitudes menores a 36° N. Entre latitudes de 36° a 39° N., se encuentran *Cx. pipiens* y *Cx. quinquefasciatus* así como híbridos de estas dos especies (Goddard 2003). Debido a su abundancia local y sus elevadas tasas de infección por VON, en particular durante las estaciones de transmisión *Cx. quinquefasciatus* (el zancudo doméstico del sur) parece ser el vector

predominante en el Sur, (Molaei *et al.* 2007). Una importante característica de *Culex quinquefasciatus* Say es que es una especie altamente antropofílica. Además de estar involucrado en la transmisión de arbovirus, en muchas regiones tropicales y subtropicales del mundo también es el principal vector de filariasis linfática. Los miembros del complejo *Cx. pipiens*, se reproduce en zanjas, alcantarillas, depósitos de agua, y agua contaminada (también se reproduce en contenedores artificiales alrededor de las casas como latas, jarras y llantas); entra en las casa produciendo un sonido familiar alrededor de las personas en la noche, pero puede volar hasta 1100 metros en una sola noche (Goddard 2003).

Otra especie de interés es *Culex nigripalpus* Theobald, que se encuentra principalmente en el sur de los Estados Unidos, Antillas, México, América Central, Trinidad, Ecuador, Colombia, Venezuela, las Guyanas, Brazil y Paraguay (*Ídem*). Con base a estudios de competencia vectorial se ha demostrado que *Cx. nigripalpus* es un vector competente del VON (Sardelis *et al.* 2001; Rutledge *et al.* 2003; Mores *et al.* 2007). En América Central aun no se sabe con exactitud cuales son las especies de zancudos transmisores de VON, sin embargo, *Culex nigripalpus* es una especie abundante en la región. Mores y colaboradores (2007) sugieren que esta especie podría funcionar como vector amplificador y como vector puente para el VON. Debido a que cada especie de zancudo presenta características diferentes en cuanto a preferencia de hábitat, ciclo de vida, etc. la determinación de la identidad de un vector a nivel de especie, se convierte en elemento indispensable para el desarrollo de programas específicos de control.

c. Vigilancia y métodos de control. La vigilancia del VON se puede realizar de forma pasiva (basada en el diagnóstico clínico de infección de VON en caballos) o por vigilancia activa (desarrollo de una red epidemiológica específica para detectar VON y/o anticuerpos dirigidos hacia el virus). Cada sistema de vigilancia tiene que adaptarse a las condiciones epidemiológicas, climáticas y geográficas del área en estudio. La vigilancia puede establecerse a cualquiera de los distintos niveles del ciclo de transmisión del VON: aves, caballos, zancudos, humanos (Dauphin *et al.* 2004). En Estados Unidos, los esfuerzos de vigilancia se han enfocado principalmente en los zancudos, aves muertas y gallinas centinelas. Entre estos, la identificación de zancudos infectados con VON son el indicador más preciso de casos humanos (Kramer *et al.* 2008).

La prevención efectiva de infecciones con VON depende de los programas de vigilancia y de control vectorial, así como de la educación pública. Sin embargo, las medidas para el control de zancudos por la aspersion de insecticidas no son eficientes, en parte debido a la gran variedad de poblaciones de mosquitos involucradas en el ciclo de transmisión (Dauphin *et al.* 2004). Las medidas de control actuales incluyen la reducción de poblaciones de zancudos y

limitar la exposición a las picaduras de zancudos con el uso de vestimenta de protección y repelentes. Así también se está estudiando el uso de biopesticidas y otras medidas de control más amigables con el ambiente para disminuir el impacto ambiental de los programas de control (Kramer *et al.* 2008). El análisis espacial de los datos de vigilancia del VON también ha probado ser un método efectivo para identificar áreas de alto riesgo y para reducir la incidencia de la enfermedad en humanos a través de los esfuerzos de control vectorial (Nielsen *et al.* 2008).

Como se mencionó anteriormente, antes del establecimiento de una medida de control vectorial, primero es necesario el estudio de diversos factores que permitan determinar aquellas especies importantes como vectores puente entre hospederos aviares y mamíferos. Para incriminar a una especie de zancudo como vector se utilizan cuatro criterios principales (Woodring, Higgs y Beaty 1996): Primero, que el vector se alimente del hospedero vertebrado en condiciones naturales de campo y que las estaciones y localidades de la actividad del vector coincidan con la incidencia de la infección en el vertebrado. En segundo lugar, el vector infectado en el ciclo natural se debe de coleccionar del campo. El tercer criterio establece que, se debe demostrar que el supuesto vector sea infectado al alimentarse de un hospedero virémico. Finalmente, se debe confirmar bajo condiciones controladas, la habilidad del vector infectado de transmitir el patógeno a un nuevo hospedero vertebrado. De acuerdo a esto, el estudio de los patrones de ingesta sanguínea, constituye una parte importante en la identificación de un vector en una localidad dada.

3. Estudio de patrones de alimentación de zancudos vectores de VON. El estudio de los patrones de alimentación de los artrópodos vectores de enfermedades, que afectan al humano y otros animales domésticos, es esencial desde el punto de vista entomológico y epidemiológico para conocer las relaciones entre hospederos y vectores. Esto también es importante para conocer el papel cada una de las especies involucradas en el ciclo de transmisión de la enfermedad (Tempelis, 1975) y para el desarrollo de estrategias de control (Parida *et al.* 2006). El análisis de la ingesta sanguínea determina el tipo de hospederos y el potencial de una especie de funcionar como vector (Niebylski y Meek 1992, Elizondo-Quiroga *et al.* 2006). Aunque un amplio rango de animales puede servir como fuente de alimentación para una especie de zancudos, muchas especies individuales de zancudos presentan preferencia por ciertas especies de vertebrados en particular (Klowden 1996). El término “preferencia de

hospedero” se refiere a la selección de un hospedero vertebrado específico como una fuente de alimento, en relación a otras especies igualmente disponibles (Washino y Tempelis 1983). Cada vector tiene su actividad diurna o nocturna característica, preferencias de alimentación y de hábitat. Las preferencias de alimentación también pueden cambiar durante la temporada de transmisión (Woodring *et al.* 1996).

Las hembras culicinas se alimentan de acuerdo a su estado dentro del ciclo gonotrópico (ciclo fisiológico de maduración de huevos en una hembra) (Nasci y Miller 1996). Los zancudos no autógenos son aquellos que requieren grandes cantidades de proteína (contenida en la sangre de los vertebrados) para completar la maduración de los huevos (Kuno y Chang 2005). Luego de la ovoposición, la hembra intenta conseguir una ingesta de sangre guiada a través de sus quimiorreceptores activados por el dióxido de carbono y otros olores que le permiten localizar al hospedero. Luego de aterrizar en la piel del hospedero e ingerir su sangre, el zancudo vuela hacia un sitio de reposo adecuado para realizar la digestión y completar el desarrollo gonotrópico. Si durante la ingesta de sangre, el zancudo es molestado y el volumen de sangre ingerido es menor al que se necesita para el desarrollo de los huevos, el zancudo intentará completar el volumen de la ingesta localizando a otro hospedero. Este comportamiento de persecución y alimentación es inhibido cuando el volumen de sangre ingerido es suficiente (Nasci y Miller 1996).

El patrón de alimentación de un zancudo puede estar dentro de dos categorías, puede ser fijo u oportunista, así los zancudos pueden ser clasificados en cuatro grupos según sus preferencias de alimentación: (i) principalmente de mamíferos, (ii) principalmente de aves, (iii) principalmente de vertebrados de sangre fría, y (iv) de una amplia gama de hospederos (Edman y Taylor 1968) según demande la situación (Marquardt, Demaree y Grieve 2000). Por otro lado, de acuerdo a los lugares de reposo luego de la alimentación, las especies de zancudos también pueden clasificarse como endofílicas, cuando permanecen dentro de las viviendas de los humanos durante la mayor parte de su ciclo gonotrópico, o exofílicas, cuando la mayoría del tiempo permanecen en el exterior (Klowden 1996).

La capacidad de alimentarse de diversos hospederos provee a los virus transmitidos por zancudos un mecanismo de sobrevivencia cuando el hospedero usual no está disponible y un mecanismo para la transmisión de virus a nuevos hospederos, usualmente incidentales. Un vector que viaja a distancia tiene más probabilidad de esparcir un virus a nuevos hospederos susceptibles en comparación a un vector que no viaja. La alimentación interrumpida también es un factor determinante de la transmisión en forma horizontal ya que el virus puede ser transmitido al segundo hospedero si el primero presentaba viremia suficiente para infectar al zancudo (Woodring *et al* 1996). La selección de la fuente de alimentación puede variar de lugar en lugar, lo cual puede alterar el papel que cada especie juega como vector enzoótico y como vector puente en distintas regiones. Las razones de estas variaciones aun no se conocen en su totalidad. Según Savage y colaboradores parece ser que la preferencia de alimentación de muchas especies de zancudos está modulada por la abundancia espacial y temporal de los hospederos potenciales y por las diferencias entre los ciclos reproductivos y otros comportamientos de dichos hospederos en las diferentes zonas (Savage *et al.* 2007). Es por esto que, como se indicó anteriormente, el estudio de las preferencias de alimentación de los zancudos son importantes para determinar su capacidad vectorial dentro de una locación dada (Molaei *et al.* 2007; Marquardt *et al.* 2000).

a. Técnicas serológicas. Para identificar la fuente de la ingesta sanguínea se han utilizado varias técnicas. Inicialmente, este análisis dependía principalmente de observaciones en el campo. Esto incluía observaciones visuales y trampas con cebo. También se utilizaban características citológicas de las ingestas sanguíneas (Washino y Tempelis 1983). Posteriormente se desarrollaron otras técnicas de laboratorio más precisas.

Una forma efectiva de identificar especies e individuos de los que se ha alimentado un artrópodo hematófago es el análisis de la ingesta de sangre que se encuentra dentro del artrópodo (Mukabana, Takken y Knols 2002). Este análisis se ha logrado con diversas técnicas, en un principio a través de métodos inmunológicos (Ngo y Kramer 2003; Tempelis 1975; Washino y Tempelis 1983). El primer ensayo utilizado para identificar a los hospederos vertebrados fue la prueba de precipitina (Tempelis y Lofy, 1963; Ngo y Kramer 2003). Más tarde se desarrollaron otras pruebas como la tinción y detección de eritrocitos por anticuerpos

fluorescentes (McKinney, Spillane y Holden 1972), la técnica de inhibición pasiva de hemaglutinación, PHI (Tempelis y Rodrick 1972), y el ELISA (Burkot, Goodman y DeFoliart 1981). Todas estas técnicas consisten en la precipitación de la fracción antigénica con el anticuerpo correspondiente dirigido hacia las proteínas solubles (Parson *et al.* 2000) y son mucho más sensibles en comparación a la prueba de precipitina (Washino y Tempelis 1983).

Aunque las pruebas serológicas han probado ser herramientas valiosas de análisis, presentan problemas inherentes, incluyendo la necesidad de producir antisueros de calidad, dirigidos contra todas las especies que se incluyen en el ensayo (Boakye *et al.* 1999). Los anticuerpos, por lo general, son de estabilidad limitada lo cual puede provocar pérdida de la calidad de la muestra, debido a la degradación parcial de los productos con el tiempo (Ngo y Kramer 2003) y su disponibilidad comercial a veces es insuficiente. Por otro lado, este tipo de análisis se restringe a un número limitado de especies ya que un taxón solo puede ser identificado cuando el anticuerpo específico se incluye en la prueba. En general, la mayoría de estas técnicas son inespecíficas a nivel de especie, ya que la mayoría únicamente indica la familia a la que la especie pertenece, las especies relacionadas pueden causar reacciones cruzadas. Entre otras desventajas está el hecho de que el análisis consume una porción significativa de la muestra, reduciendo su disponibilidad para otras pruebas (Parson *et al.* 2000).

#### b. Técnicas moleculares: Identificación de especie por genes conservados.

Las técnicas de genética molecular que se han desarrollado para identificar las especies de las que se alimentan los insectos hematófagos tienen la ventaja de que son más específicas y sensibles que los ensayos inmunológicos (Boakye *et al.* 1999; Meece *et al.* 2005). Estos métodos se basan principalmente en las variaciones de las secuencias del ADN nuclear y mitocondrial (Mukabana *et al.* 2002).

La mayor parte de las estrategias de genética para el diagnóstico de taxones explota la diversidad de secuencias de ADN para identificar organismos. Según Hebert y colaboradores, esto se asemeja a un código de barras genético que se encuentra en cada célula (Hebert *et al.* 2003a; Ratnasingham y Hebert 2006).

Las células en la sangre de aves y reptiles en su mayoría, contienen núcleo y mitocondria. Por su parte los eritrocitos de los mamíferos no contienen núcleo, aún así, en la sangre de los mamíferos, los leucocitos proveen el material genético adecuado de ADN

(Mukabana *et al.* 2002). El genoma nuclear contiene regiones codificantes (genes) y no codificantes (intrones) que generalmente contienen algunas repeticiones de secuencia simple de ADN (SSR) de 2 a 5 pares de bases (microsatélites) o de más de 5 pares de bases (minisatélites). Estas repeticiones son polimórficas y abundantes y están presentes en la mayoría de los eucariotas. Las secuencias que flanquean al micro y al minisatélite generalmente se conservan dentro de los individuos de una misma especie y por lo mismo pueden ser utilizadas para la identificación. El polimorfismo de estas secuencias es detectado de acuerdo a la diferencia de la longitud de un producto de PCR (Griffiths *et al.* 2000). Además del uso de micro o mini satélites, se puede utilizar amplificación por PCR de secuencias específicas de genes conservados como por ejemplo el gen de la subunidad 1 del citocromo c, los genes de las subunidades del enzima NADH deshidrogenasa para la identificación de especies en estudios filogenéticos (Hebert *et al.* 2003b). Sin embargo, el trabajar con secuencias de ADN nuclear es bastante difícil debido a que únicamente dos copias del cromosoma nuclear se encuentran en una célula, por lo que las estrategias dirigidas hacia el ADN mitocondrial (ADNmt) muchas veces resultan más apropiadas cuando se cuenta con una cantidad de muestra reducida (Mukabana *et al.* 2002). Asimismo, el genoma mitocondrial de los animales no posee intrones, presenta pocos eventos de recombinación y es heredado de forma haploide, monoparental, lo cual lo convierte en un mejor blanco para este tipo de análisis (Hebert *et al.* 2003a).

El ADN mitocondrial animal generalmente es pequeño (15-20 kpb), y relativamente uniforme en tamaño entre vertebrados e invertebrados. Es un genoma circular y compacto que contiene 37 genes, típicamente codificantes para 13 subunidades proteicas de las enzimas de la fosforilación oxidativa que incluyen la citocromo b, 3 subunidades de la citocromo oxidasa, una subunidad de la ATPasa y 7 subunidades de la NADH deshidrogenasa (Lang, Gray y Burger 1999; Lewin 2004). Además también codifica para los dos ARNr del ribosoma mitocondrial y los 22 ARN de transferencia necesarios para la traducción de las proteínas codificadas por el mismo ADN mitocondrial (Boore 1999). Aunque el arreglo de estos genes usualmente permanece sin cambio entre organismos, el ADNmt animal evoluciona rápidamente (Brown, George y Wilson 1979). Esto produce regiones con suficiente variación para distinguir entre poblaciones, pero lo suficientemente conservado para establecer relaciones de filogenia (Mota *et al.* 2007). Las diferencias entre estas secuencias también pueden ser utilizadas para identificarlas mediante una simple reacción en cadena de la polimerasa, PCR (Kocher *et al.* 1989).

Se han desarrollado distintos ensayos moleculares para identificar la fuente de la ingesta sanguínea en zancudos y otros artrópodos hematófagos (Boakye *et al.* 1999; Lee *et al.* 2002; Ngo y Kramer 2003; Kent y Norris 2005; Mota *et al.* 2007). La mayoría de estos ensayos están basados en la detección del gen del citocromo *b*, proteína del complejo III del sistema mitocondrial de fosforilación oxidativa, el único citocromo codificado por el genoma mitocondrial (Irwin *et al.* 1991). La ventaja de utilizar este gen reside en que es un gen bien caracterizado que presenta más del 2% de divergencia entre especies estrechamente relacionadas (Johns y Avise 1998). Dentro de las técnicas desarrolladas se ha implementado diversos tipos de PCR: PCR múltiplex, ensayo heterodúplex con sondas específicas, ensayo combinado a enzimas de restricción (RFLP), polimorfismo de longitud de fragmentos amplificados (AFLP) y secuenciación (Kent y Norris 2005; Boakye *et al.* 1999; Lee *et al.* 2002, Meece *et al.* 2005; Mukabana *et al.* 2002; Molaei *et al.* 2006).

Cualquiera que sea la estrategia de identificación de ingesta sanguínea, los marcadores genéticos moleculares deben permitir: (1) una identificación precisa de los índices antropofílicos de las especies de artrópodos hematófagos para evaluar el riesgo de transmisión de las enfermedades transmitidas por vectores; (2) proveer una herramienta de evaluación de la eficiencia y eficacia de los programas de control enfocados a reducir el contacto entre el humano y el vector y (3) contribuir a mejorar la capacidad de detectar hospederos reservorios de los distintos patógenos (Mukabana *et al.* 2002).

c. **Análisis de datos.** Desde el punto de vista epidemiológico es importante saber hasta que punto, la disponibilidad y preferencia de los hospederos influyen en el patrón de alimentación de una especie de zancudos en particular, así también es importante conocer las condiciones de disponibilidad de hospederos bajo las cuales las preferencias de alimentación de un zancudo se pueden desviar de su hospedero normal (Hess, Hayes y Tempelis 1968). El índice de picadura-humano (HBI), es la proporción de la población de zancudos que se alimenta de humanos, es una medida tanto de la preferencia del hospedero como de su disponibilidad en un área. El HBI también indica la importancia de especies en particular como vectores de patógenos humanos (Klowden 1996). El HBI se utiliza para hacer comparaciones de preferencia de hospederos. Este parámetro se define como la proporción de insectos recién alimentados que contienen sangre humana sobre el total de insectos alimentados (Black y Moore 1996).

En los estudios en los que se estiman los índices de preferencia de hospederos, raramente los hospederos se encuentran disponibles de forma equivalente para el vector; y lo que parece ser una preferencia resulta ser tan solo una medida de las especies de hospederos más comunes o más accesibles de la localidad en estudio. El cálculo de la razón de alimentación y del índice de alimentación (FR y FI respectivamente por sus siglas en inglés) puede ayudar a eliminar los efectos de la densidad de hospederos (Black y Moore 1996). La FR ajusta el HBI al tomar en cuenta el número de hospederos disponibles. La FR se describe como el porcentaje de zancudos que se han alimentado de un hospedero dado dividido entre el porcentaje que este representa de la población total de hospederos disponibles en el hábitat del zancudo. La FR permite distinguir entre especies con preferencias de alimentación fijas de aves o mamíferos de aquellas que presentan un patrón de alimentación variable u oportunista, influenciado principalmente por la disponibilidad de hospederos. La FR permite convertir los datos en índices de preferencia de hospederos los cual ayuda a evaluar mejor estos estudios para fines ecológicos y epidemiológicos (Hess *et al.* 1968).

Por otro lado, el FI se define como la proporción de zancudos alimentados de un hospedero respecto a otro, dividido por la proporción comparativa esperada de zancudos alimentados en los dos hospederos, basado en los factores que afectan la alimentación (Kay *et al.* 1979). El FI se basa en que los patrones de alimentación son atribuibles a la preferencia de hospederos, y presenta la ventaja de que no se requiere un censo completo, además ayuda a evaluar algunos factores que influyen en los patrones de alimentación (Tempelis y Washino 1983). El FI ajusta el HBI tomando en cuenta la densidad de hospederos, el tamaño del hospedero, su edad y los eventos de coincidencia espacial entre el hospedero y el vector. Tanto en la FR como con el FI los valores iguales a uno indican ninguna preferencia ni evasión del hospedero, comportamiento oportunista, mientras que los valores significativamente mayores a uno indican preferencia de un hospedero específico (Black y Moore 1996).

Para determinar la disponibilidad de hospederos en el caso de las aves (reservorios) los datos de abundancia generalmente pueden obtenerse a partir de los resultados de conteos terrestres de las especies locales (Patrican *et al.* 2007). El uso de puntos de conteo para estimar la densidad de aves generalmente provee estimaciones más acertadas de las densidades de aves reales en comparación a los conteos por redes (Hassan *et al.* 2003). En muchos lugares, estos conteos se realizan como parte de estudios de biodiversidad por ornitólogos especializados. En otras regiones, la determinación de la frecuencia de hospederos se realiza como parte de los

estudios ecológicos de los sistemas de vigilancia de enfermedades zoonóticas transmitidas por vectores. En el caso de los hospederos incidentales (animales domésticos, humanos, etc.) en diversos estudios, las encuestas o censos proveen los datos necesarios acerca de la disponibilidad y abundancia de las distintas especies de un ambiente urbano (Gomes *et al.* 2003; Hess *et al.* 1968). En otros estudios también se ha utilizado la prueba de  $\chi^2$  para analizar cambios estacionales en las patrones de alimentación de los zancudos respecto a hospederos específicos, y para observar diferencias significativas en el número de ingestas sanguíneas derivadas de distintas fuentes (Apperson *et al.* 2004; Molaei *et al.* 2007; Savage *et al.* 2007).

De acuerdo a estos índices y al origen de la ingesta sanguínea determinada por las diversas técnicas anteriormente descritas, una especie puede ser etiquetada arbitrariamente como antropofílica, con mayor preferencia por alimentarse de humanos, o zoofílicos, con mayor preferencia de alimentarse de otros animales (Klowden 1996). En el caso de *Culex quinquefasciatus*, se ha reportado que esta especie adquiere su ingesta de sangre a partir de un rango diverso de aves y mamíferos en proporciones significativas, dependiendo de la abundancia relativa y disponibilidad de hospederos vertebrados dentro de un área geográfica específica (Molaei *et al.* 2007; Savage *et al.* 2007; Elizondo-Quiroga 2006). Este estudio se enfoca en el análisis de las preferencias de alimentación de esta especie (*Cx. quinquefasciatus*) vector del VON en otras regiones del mundo, en un foco de transmisión localizado en Guatemala (ver más adelante, Marco Metodológico).

## B. Justificación

Recientemente se ha reportado circulación enzoótica del virus del Oeste del Nilo en varios países de América Latina, incluyendo Guatemala. Debido a que se ha observado que este virus se comporta de distintas formas en las distintas regiones del mundo, únicamente los estudios ecológicos locales podrán proveer datos reales que permitan evaluar el impacto de este patógeno en el país. Aunque en Guatemala, el virus ha sido aislado de distintas especies de zancudos del género *Culex*, aun no se conoce cuál de éstas puede ser importante para la transmisión del virus a hospederos vertebrados incidentales como el humano.

La presencia de vectores competentes es un factor de riesgo asociado con infecciones humanas en las zonas endémicas del VON. En este estudio se seleccionó uno de los vectores potenciales de VON (*Culex quinquefasciatus*), debido a sus hábitos de alimentación reportados en otras regiones del mundo, variados y oportunistas, y a que es una de las especies más abundantes en una zona de transmisión activa del virus. Con el estudio de las preferencias de alimentación de esta especie en conjunto con otros estudios de comportamiento y competencia vectorial, es posible determinar si la especie en específico, es capaz de transmitir el virus entre hospederos aviares y mamíferos. De ser así, se pueden obtener datos que permitirán el desarrollo de medidas de control y prevención del VON en ésta y otras regiones del país.

Finalmente, los datos de los análisis de ingesta sanguínea combinados con los datos de vigilancia entomológica (tasas de infección de zancudos vectores) podrán utilizarse para determinar cuáles son las especies principales de reservorios, definir las épocas o estaciones de transmisión (época en la que las tasas de infección en zancudos coinciden con un pico de abundancia en las poblaciones de vectores) e identificar los factores de riesgo, es decir, aquellos factores que favorecen el contacto entre el vector y el humano.

## C. Objetivos

1. Objetivo general. Determinar las preferencias de alimentación sanguínea de zancudos *Culex quinquefasciatus* capturados durante el año 2007 en un foco de transmisión del virus del Oeste del Nilo localizado en Puerto Barrios, Izabal

2. Objetivos específicos

- a. Identificar la fuente de ingesta sanguínea de *Culex quinquefasciatus* colectados en 2007 en el ambiente peri-doméstico urbano y peri-urbano de un foco de transmisión de VON, Puerto Barrios, Izabal

- b. Determinar si la presencia y proporción relativa de hospederos domésticos aviares y mamíferos afecta los patrones de alimentación de *Cx. quinquefasciatus*.
- c. Relacionar la transmisión del virus del Oeste del Nilo observada en gallinas con las preferencias de alimentación de *Culex quinquefasciatus* en los ambientes urbano y peri-urbano de Puerto Barrios, Izabal.

#### D. Hipótesis

1. Los zancudos *Culex quinquefasciatus* del área urbana de Puerto Barrios, Izabal, capturados en 2007, se alimentan de hospederos aviares y mamíferos por igual.
2. Las preferencias de alimentación sanguínea de *Culex quinquefasciatus*, capturados en 2007 en Puerto Barrios, varían de acuerdo a la abundancia de hospederos en esta localidad.
3. *Culex quinquefasciatus* es una de las especies de zancudos implicada en la transmisión de VON a gallinas de Puerto Barrios, Izabal.
4. El patrón de alimentación de *Culex quinquefasciatus*, varía de acuerdo a su hábitat (i. e. Urbano, periurbano, etc.).
5. El patrón de alimentación de *Culex quinquefasciatus*, varían a lo largo del año.

## II. MARCO METODOLÓGICO

### A. Procedimiento

#### 1. Muestreo e identificación de zancudos

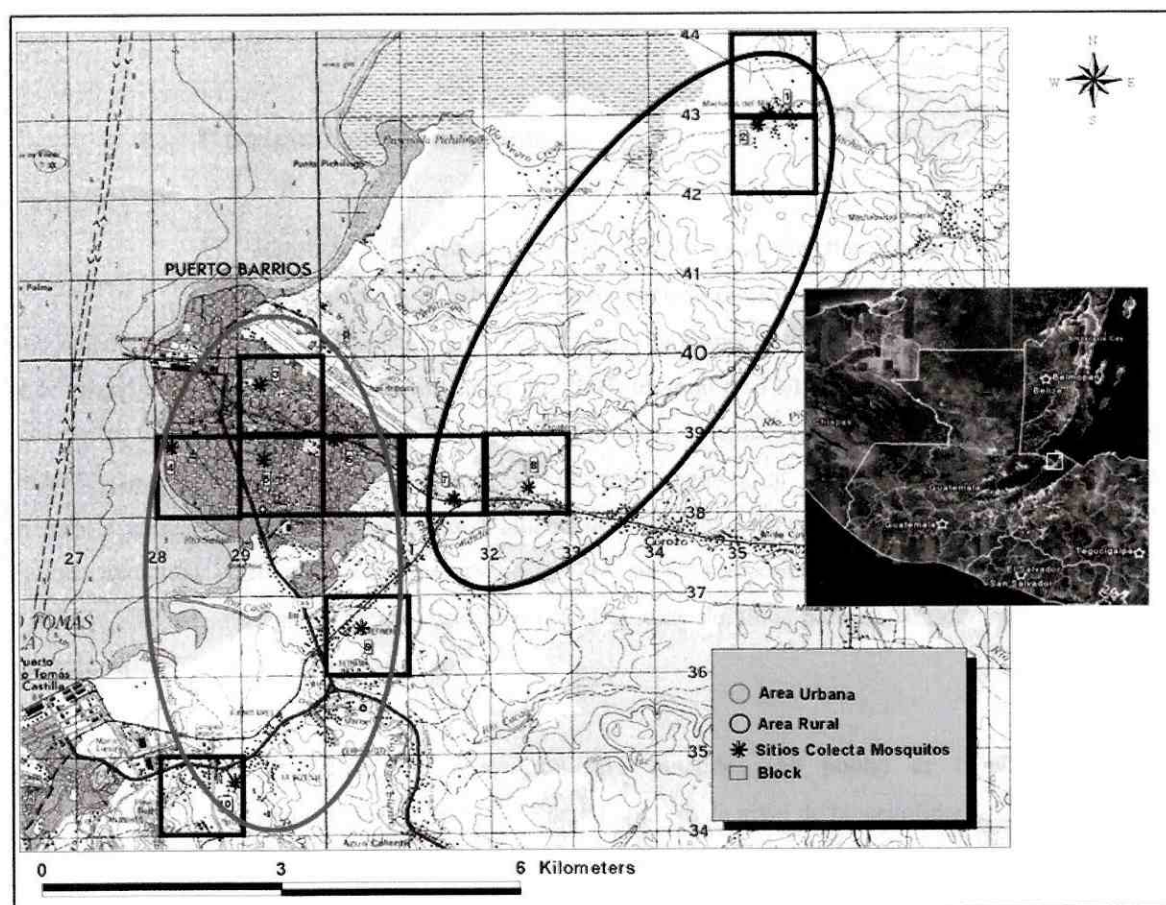
a. Sitio de estudio. El sitio de estudio se localiza en el municipio de Puerto Barrios (15°50' N y 88°28' O), Departamento de Izabal. Ubicado en la costa del Caribe, este municipio tiene un área aproximada de 1,292 Km<sup>2</sup>. Colinda al norte con la bahía de Amatique, conocida también como Santo Tomás de Castilla, Golfo de Honduras, Mar Caribe; al este con el Golfo de Honduras y la República de Honduras; al sur con la República de Honduras y Morales Izabal; al oeste con Morales, Los Amates y Livingston Izabal. Este municipio comprende una población total de alrededor de 81,000 habitantes (INE 2002), 40% del los cuales residen en el área rural.

El hábitat de Puerto Barrios se caracteriza por ser una zona de vida con bosque húmedo subtropical. Sin embargo, según el modelo Thornthwaite, las condiciones climáticas corresponden a un régimen hiper-húmedo, megatérmico, tipo ArA'a'; húmedo y caliente, sin una estación de sequía bien definida. Aún así, se distinguen tres meses secos (febrero a abril). La precipitación anual promedio es de 3,500 mm (INSIVUMEH, 2008). Estos factores climáticos, sumados al ambiente rural, hacen que localidad de Puerto Barrios reúna los factores necesarios para que la transmisión del VON sea viable.

De acuerdo a los resultados preliminares (detección de transmisión activa en animales centinela) obtenidos para este departamento, los investigadores del Laboratorio de Arbovirología del CES/UVG-CDC/CAP (ver antecedentes), diseñaron una zona de estudio que abarca un área de 80 Km<sup>2</sup> comprendida en la municipalidad de Puerto Barrios, y cercano a Machacas del Mar, a la cual se le denominó "Foco de Transmisión" (Figura 4). En esta zona se seleccionaron al azar, 10 cuadrantes de 1 Km<sup>2</sup> cada uno, y se clasificaron como urbano (4), periurbano (2), rural (2) y perirural (2) de acuerdo al tipo de hábitat (vegetación, número de casas, presencia de caminos, ríos, etc.) (Monzón, 2007). Los distintos tipos de hábitats están clasificados de forma empírica por el porcentaje de estructuras urbanas (caminos, casas, puentes, etc.) que cubren la superficie y por el porcentaje de vegetación. En general los hábitats urbano y

periurbano se caracterizan por tener el 40% o más de infraestructura en su superficie y  $\leq 20\%$  de vegetación, principalmente hábitats modificados por el hombre (jardines por ejemplo) y casas de uno o más niveles. Para localizar los sitios de muestreo se utilizó Sistemas de Posicionamiento Global (GPS) con receptores con una precisión de  $\pm 10$  metros. Dentro de estos cuadrantes se ha realizado desde marzo de 2006 las actividades de vigilancia de VON que incluyen monitoreo por serología en animales centinela (gallinas) y colecta de zancudos.

Figura 4. Sitio de estudio, Puerto Barrios, Izabal. Estudio Foco de Transmisión. Los cuadrantes aparecen señalados en recuadros, y con asterisco, los sitios de vigilancia por aves centinela y colecta de zancudos



(Laboratorio de Arbovirología, CES-UVG/CDC-CAP).

b. Muestreo y métodos de colecta. Se trabajó con zancudos de la especie *Culex quinquefasciatus* Say capturados durante el año de 2007 en los diferentes cuadrantes de la zona Urbana y Peri-urbana (6 cuadrantes), dentro del estudio de foco de

transmisión. Para la captura se utilizaron trampas CDC de luz (Sudia y Chamberlain 1962) y trampas grávidas (Reiter 1983). En cada sitio de trabajo se colocó una trampa de CDC luz (John W. Hock CO., Gainesville, FL. USA) utilizando CO<sub>2</sub> (hielo seco) como cebo, y una trampa grávida con estiércol de vaca y agua como sebo. Las colectas se realizaron mensualmente, y durante los meses en los que se reportó seroconversiones en gallinas centinela se colocaron trampas extras para aumentar el esfuerzo de captura (Cordón-Rosales y Morales 2008). Los zancudos colectados se colocaron en hielo seco y se separaron de otros insectos. Se separaron en tubos criogénicos en grupos de ~50 individuos por frasco para evitar que los zancudos perdieran partes corporales importantes para su identificación y pruebas moleculares. Las muestras fueron transportadas en hieleras con hielo seco al laboratorio de la UVG y se almacenaron a -70°C hasta su procesamiento para identificación.

### c. Procesamiento de muestras

1) **Identificación.** La clasificación de los zancudos fue realizada por entomólogos especializados con base a características morfológicas (Clark-Gil y Darsie 1983). Los zancudos se separaron por fecha, sitio de captura, tipo de trampa, especie y sexo y a cada grupo o pool se le asignó un código único de identificación. En 2007, un total de 72,166 (3,264 pools) de los zancudos colectados, fueron hembras de distintas especies Puerto Barrios, Izabal. De estos, 4,576 (316 pools) fueron identificados como *Culex quinquefasciatus* y separados según eran grávidas (n=2,114), alimentadas (n=536) o vacías (n=1,926). De las hembras alimentadas un total de 489 (91.2%), equivalente a 75 pools, fueron capturadas entre los cuadrantes urbano (n=316, 64.6%) y periurbano (n=173). Los zancudos de treinta y ocho de estos pools fueron disecados con desecante de sílice para su conservación, el resto se almacenó a -70°C hasta su procesamiento.

2) **Disección.** Se procesaron 431 zancudos (68 pools) de hembras culicinas alimentadas. Se trabajó en un laboratorio de nivel de bioseguridad 2+, en una cabina de bioseguridad Clase 2 tipo A. Sobre un portaobjeto, limpio, a cada zancudo se le separó el abdomen de la cabeza y el tórax con pinzas y pines para insectos. Las pinzas se desaguaron en detergente y luego etanol al 70% entre cada individuo procesado. Cada abdomen se colocó en un tubo con un número único de identificación y se procesó para el análisis de ingesta sanguínea. La cabeza y el tórax se colocaron nuevamente en el tubo identificado con el número de pool y se procesaron como tales para la detección de flavivirus y VON con técnicas moleculares como se explica más adelante.

## 2. Pruebas de laboratorio

a. **Análisis de ingesta sanguínea.** Para el análisis del contenido sanguíneo de los abdómenes de los zancudos alimentados, se montaron diversas técnicas en el laboratorio de Arbovirología. Como parte de este trabajo se redactó un Procedimiento Operacional Estándar (POE) para cada uno de los ensayos descritos a continuación, incluyendo también el ensayo de disección (ver Apéndice I).

1) **Extracción de ADN.** Para realizar la extracción de ADN, los especímenes secos se re-hidrataron con 100  $\mu$ L de solución tampón SSC 2X (SIGMA, St. Louis, MO) al 1% de SDS (Bioamérica, Homestead, FL), por 20 min., se lavaron con solución tampón TE (1.0 M Tris-HCl, pH 8.0, EDTA 0.1 M) (SIGMA) por 10 min. Se utilizó, según disponibilidad, dos métodos de extracción para obtener el ADN del contenido sanguíneo de los abdómenes de los zancudos alimentados. Se utilizó el kit QIAamp DNA mini kit (Qiagen, Valencia, CA) según las instrucciones del fabricante, y el reactivo de DNA-zol de Invitrogen (Carlsbad, CA) (R. J. Kent, 01/2008, comunicación personal). Brevemente, para la extracción con DNA-zol, se homogenizó cada abdomen con un pistilo azul de polipropileno en un tubo con 100  $\mu$ L de DNAzol, hasta que ya no hubiesen partes reconocibles del tejido. Se centrifugó en una microcentrífuga por 10 min a 10 000 g (10 400 rpm) a 15°C. El ADN del sobrenadante se precipitó con 50  $\mu$ L de etanol al 100% y luego de incubar a temperatura ambiente por 3 min, se centrifugó a 5 000g (7 300 rpm) por 5 min a 15°C. El sedimento se lavó dos veces con 1 mL de etanol al 75%, se secó al aire y se reconstituyó en 100  $\mu$ L de solución tampón AE (Qiagen) (10 mM Tris-Cl, 0.5 mM EDTA; pH 9.0), se almacenó a 4°C por 10 a 12 horas o hasta el día siguiente y finalmente, se almacenó las muestras a -70°C hasta que se realizaron las siguientes pruebas.

2) **Control de calidad de extracción de ADN.** Para verificar la calidad del ADN extraído de los abdómenes se realizó una PCR para amplificar un fragmento de la subunidad 4 de la enzima NADH deshidrogenasa codificada por el genoma mitocondrial (R. J. Kent 01/2008, comunicación personal; Simon *et al.* 1994). Se utilizaron los cebadores ND4for (5'-GTDYATTTATGATTRCCTAA-3') y ND4rev (5'-CTTCGDCTTCCWADWCGTTC-3') con un producto de amplificación de alrededor de 400 pares de bases (Gorrochotegui-Escalante *et al.* 2000). Se prepararon las reacciones con un volumen final de 20  $\mu$ L con 1.0  $\mu$ L de la plantilla de ADN, 1.0  $\mu$ L de cada cebador (100 pmol), 2  $\mu$ L de solución tampón 5X (concentración final de Tris 10 mM, pH 8.3, KCl 50 mM, MgCl 1.5 mM, gelatina 0.01%) (Promega, Madison, WI), 0.5  $\mu$ L de dinucleótidos trifosfato (250  $\mu$ M c/u) (Applied Biosystems, Foster City, CA), 1 U de enzima Taq ADN polimerasa (Promega) y completado al volumen final con agua libre de

ARNasas y ADNasas (Invitrogen). Las condiciones de reacción para la PCR incluyó un paso de activación inicial a 95°C por 3 min, 10 ciclos de 30 segundos a 92°C, 60 segundos a 48°C y 40 segundos a 72°C, seguido de 30 ciclos de desnaturalización a 92°C por 30 segundos, hibridización a 52°C por 35 segundos y extensión a 72°C por 40 segundos. Una extensión final de 5 min a 72°C y enfriamiento de las muestras a 4°C. El producto de amplificación se visualizó en un gel agarosa al 2 % teñido con bromuro de etidio. Para todas las reacciones de PCR de punto final a partir del ADN extraído se utilizó el termociclador ATC 4012, Nyx Technik, Inc (San Diego, CA).

3) Identificación de hospederos. Resultados preliminares sugerían que las gallinas eran el hospedero mayoritario de *Cx. quinquefasciatus* (Kent, 2008), con base a esto el procesamiento de las muestras se realizó en el siguiente orden (ver Apéndice II): En primer lugar un PCR con cebadores específicos para gallina (*Gallus gallus*). Las muestras que no presentaron amplificación fueron analizadas por un PCR específico para orden (ave o mamífero). Aquellas muestras para las cuales se obtuvo producto de amplificación con los cebadores para mamífero, se analizaron con el PCR múltiplex para determinar si el hospedero específico era humano, canino, bovino o caprino. Las muestras positivas en el PCR para orden y negativas para los PCRs de especie, fueron analizadas por secuenciación del fragmento amplificado por los cebadores AviFor y AviRev. La forma en que se realizó cada ensayo de PCR así como la reacción de secuenciación se detalla a continuación.

Para identificar si el origen de la ingesta de sangre era aviar o mamífero se utilizó el ADN extraído para realizar una reacción de PCR con cebadores específicos consenso para orden, diseñados para amplificar fragmentos del gen del citocromo b del ADN mitocondrial (R.J. Kent 01/2008, comunicación personal). Para esto se utilizaron cebadores descritos previamente por otros autores, específicos para mamífero [(MamFor) 5'-CGAAGCTTGATATGAAAACCATCGTTG-3'y (MamRev) 5'- TGTAGTTRTCWGGGTC HCCTA-3'] con un producto esperado de 772 pares de bases, pb (Ngo y Kramer 2003) y específicos para el orden Aves [(AviFor) 5'-GACTGTGACAAAATCCNTTCCA-3' y (AviRev) 5'-GGTCTTCATCTYHGGYTCA CAAGAC-3'] con un producto de 508 pb tanto para mamíferos como para aves, y un producto secundario de ~290-bp solo para aves (Cicero y Johnson 2001). Los segmentos del *citocromo b* se amplificaron por separado para cada par de cebadores, utilizando un volumen final de reacción de 25 µL conteniendo 2.0 µL de muestra, buffer 1X (Tris 10 mM, pH 8.3, KCl 50 mM, MgCl 1.5 mM, gelatina 0.01%), 1.0 µL de dNTPs (10 mM c/u), 0.5 µL de cada cebador, 1 U de Taq DNA polimerasa y 16.8 µL de agua libre de

ADNasas y ARNasas. Se preparó un control negativo con 1.0  $\mu\text{L}$  de agua DEPC y dos controles sin plantilla. El programa de amplificación incluyó un paso de activación inicial a 95°C por 5 min, seguido de 35 ciclos de desnaturalización a 94°C por 30s, hibridización a 55°C o a 53.4°C por 30s, para el par de cebadores Mam o para el par de cebadores Avi; y extensión a 72°C por 90s. Con una extensión final de 4 min a 72°C. Los productos de amplificación se visualizaron en geles de agarosa al 2%, teñidos con bromuro de etidio. Se utilizó como control positivo ADN extraído de sangre de cabra (control positivo mamífero) y de gallina (control positivo ave).

Para identificar el hospedero mamífero específico de cada ingesta de zancudo analizada se realizó una reacción de PCR múltiplex para amplificar fragmentos especie-específicos del *citocromo b* (Cuadro 2). Se utilizaron cebadores específicos para humano (*H. sapiens*), cabra (*C. hircus*), perro (*C. familiaris*) y vaca (*B. taurus*) (Kent y Norris 2005). Para un volumen final de reacción de 25  $\mu\text{L}$  se utilizó 2.5  $\mu\text{L}$  de buffer 5X (Tris 50 mM, pH 8.3, KCl 250 mM, MgCl 7.50 mM, gelatina 0.05%), 0.1  $\mu\text{L}$  de dNTPs (2.50 mM c/u) (Invitrogen), 0.5  $\mu\text{L}$  (50pmol) de los cebadores UNREV1025, Human741F, Goat894F, Dog368F, Cow121F, 1 unidad de Taq DNA polimerasa y agua libre de ADNasas y ARNasas para completar. El programa de amplificación incluía un paso de activación de 5 min a 95°C, seguido de 30 ciclos de desnaturalización a 95°C por 1 min, hibridización a 57°C, por 1 min y extensión a 72°C por 1 min, con una extensión final de 7 min a 72°C. Se utilizó como controles positivos ADN extraído de sangre de cada especie de hospedero a identificar. Para identificar si el hospedero aviar específico era gallina (*G. gallus*) se realizó una reacción aparte bajo las mismas condiciones con los cebadores Chick1123R y UNFOR1029 (Kent et al. 2007). La temperatura de hibridización para esta reacción fue de 58°C.

Para las muestras que no presentaron amplificación por el ensayo de PCR específico para especie, fueron amplificadas nuevamente con los cebadores AviFor y AviRev, bajo las condiciones descritas anteriormente. Los productos de PCR se purificaron en columnas para centrifugación de PCR, Montage (Millipore, Billerica, MA). Los productos purificados fueron enviados al laboratorio de referencia, Rama de Enfermedades Arbovirales del Centro para Control y Prevención de Enfermedades, División de Enfermedades Infecciosas Transmitidas por Vectores (ADB/DBVID/CDC por sus siglas en inglés), Fort Collins, CO, EE.UU. para su identificación por secuenciación por ciclos. Brevemente, para la reacción de secuenciación se utilizó el kit de secuenciación ABI Prism BigDye Terminator v3.0. (Applied Biosystems) según las instrucciones del fabricante, se utilizó 3.0  $\mu\text{L}$  del templado de ADN, 8.0

$\mu\text{L}$  de mezcla de secuenciación (conteniendo buffer, enzima Taq y dNTPs marcados), 3.2 pmol de cebador y  $\text{H}_2\text{O}$  para un volumen final 20  $\mu\text{L}$ . El programa para la amplificación (ABI 2007) consistió en 24 ciclos de: rampa de 1°/s a 96°C, incubación a 96°C por 30 s, declive de 1°/C a 50°C, incubación a 50°C por 15 segundos, rampa de 1°/s a 60°C e incubación a 60°C por 4 min. Las secuencias obtenidas se compararon con secuencias de la base de datos de GenBank a través del programa BLAST disponible en internet ([www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi)) para su identificación.

**Cuadro 2. Secuencia de cebadores especie-específicos basados en el gen *citocromo b***

<b>Cebador</b>	<b>Secuencia 5'- 3'</b>	<b>Tamaño de producto con UNREV1025 (pb)</b>
Human741F	GGCTTACTTCTCTTCATTCTCTCCT	334
Goat894F	CCTAATCTTAGTACTTGACCCCTTCCTC	132
Dog368F	GGAATTGTACTATTATTCGCAACCAT	680
Cow121F	CATCGGCACAAATTTAGTCG	561
UNFOR403	TGAGGACAAATATCATTCTGAGG	623
UNREV1025	GGTTGTCCTCCAATTCATGTTA	-
Cow371R	GAGCTAGAATTAGTAAGAGGGCC	313 con cebador UNFOR403
Chick1123R	GAAGAGGATAAGTAGGATGGTGAAG	95 con cebador UNFOR1029
UNFOR1029	TAACCTGAATCGGAAGCCAACC	-

(Tomado y modificado de Kent y Norris 2005)

#### b. Detección de genoma viral por métodos moleculares.

1) **Maceración de zancudos.** Los grupos o pools de cabezas y tórax separadas de los zancudos alimentados se utilizaron para la detección del genoma viral de flavivirus y de VON por métodos moleculares. Para esto, se maceró el tejido con 1.75 mL de solución diluyente BA-1 (Medio 199 – Sales de Hank 1X con L-Glutamina, Tris-HCl 0.5M pH 7.5. Albúmina sérica bovina al 1% pH 7, L-Glutamina 2 mM, bicarbonato de sodio 0.35g/L, penicilina 100 U/mL, estreptomycin 100  $\mu\text{g/L}$  y anfotericina B [funjizona] 1  $\mu\text{g/mL}$ ) y un balón de cobre. Se utilizó un macerador eléctrico (Retsch, Newtonwn, PA) modelo MM 301 a 25 rpm por 4 min. Se centrifugó a 4 000 rpm por 12 min y se almacenan los pools en alícuotas de 750  $\mu\text{L}$  a -70°C para extracción del ARN viral.

2) Extracción de ARN viral. Se trabajó con materiales exclusivos para ARN, todas las áreas de trabajo se limpiaron con cloro 10%, etanol 70% y RNase free (CLP, San Diego, CA). El ARN se extrajo de 140  $\mu$ L de la alícuota más limpia de macerado con el kit Qiamp Viral RNA (Qiagen), según las especificaciones del fabricante. Se utilizó para el control negativo 140  $\mu$ L agua libre de ARNasas. La muestra se homogenizó con 560  $\mu$ L de buffer AVL y se incubó a temperatura ambiente por 10 min. Se agregaron 560  $\mu$ L de etanol (96-100%). Luego de purificar con las columnas de separación, el ARN se lavó con 500  $\mu$ L de los buffers AW1 y AW2, se centrifugó a 13 200 rpm por cuatro min y se resuspendió en 60  $\mu$ L de buffer AVE para ser almacenado a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta la realización de las siguientes pruebas.

3) Detección de flavivirus. Para la detección de flavivirus, se realizó un PCR de transcripción reversa (RT-PCR) utilizando los cebadores consenso FU1 y cFD2 que amplifican para una región dentro del gen NS5 de alrededor de 250 pb (Kuno et al. 1998) con 2  $\mu$ L de ARN de cada muestra. Se utilizó el kit QuantiTect SYBR Green two-step RT-PCR (Qiagen) según las indicaciones del fabricante con un volumen final de reacción de 20  $\mu$ L. El programa de amplificación (PTC-200 MJ Research, Nevada, USA) incluyó la reacción de transcriptasa reversa a  $50^{\circ}\text{C}$  por 30 min y a  $95^{\circ}\text{C}$  por 15 min, seguido de una amplificación de 45 ciclos a  $94^{\circ}\text{C}$  por 15 s,  $55^{\circ}\text{C}$  por 30s y a  $72^{\circ}\text{C}$  por 30s, finalizando con una desactivación de enzima a  $95^{\circ}\text{C}$  por 1min. Se utilizaron controles positivos de ARN de VON y DEN-2 (1:500). Los resultados se visualizaron en gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio. Con 5  $\mu$ L de cada muestra, 3  $\mu$ L de marcador molecular de 100 pb (Promega) y 2  $\mu$ L de buffer de carga (Promega).

4) Detección de VON. Para la detección de ARN de VON se utilizó el ensayo de RT-PCR Tiempo Real de TaqMan descrito por Lanciotti y colaboradores (2000). Se utilizaron 5  $\mu$ L de ARN junto con cebadores y sonda específicas para las regiones no codificantes del genoma de VON. Esto se realizó con el kit Quantitect Probe RT-PCR (QIAGEN) según las instrucciones del fabricante. Con un volumen final de reacción de 15  $\mu$ L con 7.5  $\mu$ L de buffer IX, 0.075  $\mu$ L de cada cebador (WN10668 y WN10770c), 0.15  $\mu$ L de RTmix (enzima), 0.09  $\mu$ L de la sonda (5'-FAM-TCTGCGGAGAGTGCAGT CTGCGAT-TAMRA-3') y H<sub>2</sub>O libre de ARNasas para completar. El programa de amplificación incluyó un ciclo de transcripción reversa a  $50^{\circ}\text{C}$  por 30 min y a  $95^{\circ}\text{C}$  por 15 min, seguido de 45 ciclos de desnaturalización  $95^{\circ}\text{C}$  por 15s de hibridización y extensión a  $60^{\circ}\text{C}$  por 1 min. Se consideraron como positivas, las reacciones con un Ct menor a 38. Las muestras que presentaron amplificación en cualquiera de los ensayos moleculares de RT-PCR fueron consideradas como presuntas positivas y fueron enviadas al laboratorio de Diagnóstico y Referencia de ADB/DBVID/CDC para su confirmación por otras pruebas moleculares y ensayos de aislamiento viral.

## B. Análisis estadístico

1. Análisis de ingesta sanguínea. Se calculó el intervalo de confianza al 95% para las ingestas sanguíneas por cada hospedero identificado. Se utilizó la fórmula  $95\% \text{ IC} = \pm 1.96 \times \sqrt{(p(1-p)/n)}$ , en donde  $p$  = la proporción de ingestas sanguíneas de un hospedero dado y  $n$  = el número total de ingestas identificadas (Apperson *et al*, 2004; Daniel, 2002). Este intervalo de confianza se calculó únicamente cuando el número de ingestas sanguíneas derivadas de un hospedero dado era 5 o mayor de 5. Para observar si el patrón de alimentación de *Cx. quinquefasciatus* difería en relación a los distintos hospederos identificados, se utilizó la prueba de  $\chi^2$  para tendencias con la corrección de Bonferroni para múltiples comparaciones. La misma prueba se aplicó para observar cambios en el comportamiento alimenticio a lo largo del año (por mes y por época del año, “seco” y “húmedo” de acuerdo a porcentaje de humedad relativa y precipitación pluvial) y por hábitat. Todas las pruebas se realizaron a un nivel de confianza del 95%. Se utilizó el programa GraphPad Prism versión 5.02 Trial para Windows (GraphPad Software, San Diego, CA). La corrección de Bonferroni se realizó manualmente.

En los sitios de captura, se realizaron encuestas en los meses de junio a diciembre para determinar el número relativo de hospederos disponibles (humanos y animales domésticos). Para calcular el índice de alimentación, el número total de hospederos en el sitio del estudio (área urbana) se estimó como el promedio mensual de cada especie contada. El índice de preferencia de *Cx. quinquefasciatus* para cada hospedero se determinó a través del índice de alimentación (FI) (Kay *et al.* 1979). El FI se calculó según  $FI = (Ne/Ne')/(Ef/Ef')$  donde  $Ne$  = número de ingestas derivadas del hospedero 1,  $Ne'$  número de ingestas derivadas de hospedero 2,  $Ef$  = proporción esperada de ingestas derivadas del hospedero 1,  $Ef'$  proporción esperada de ingestas derivadas del hospedero 2. La proporción esperada corresponde a la proporción del hospedero en relación al otro en el sitio estudiado. Un valor de FI de 1.0 indica que no hay preferencia ni evasión de un hospedero determinado; un  $FI > 1$  indica una tendencia de selección de

un hospedero en particular, mientras que un FI <1 indica una evasión del hospedero a favor de otros hospederos disponibles.

2. Detección de flavivirus y VON. Para el análisis de los resultados de las pruebas moleculares de detección de los genomas virales de flavivirus y VON, se calculó la Estimación Máxima más Probable (MLE por sus siglas en inglés) que es el número más probable de zancudos infectados (por cada mil) en una población dada. Se utilizó el software PooledInfRate versión 3.0 en Excel® (Biggerstaff, 2006) a un nivel de confianza del 95%. Para el cálculo de la MLE, se combinaron los resultados de las pruebas moleculares obtenidos para los zancudos alimentados *Culex quinquefasciatus*, con los resultados obtenidos para los zancudos no alimentados de esta misma especie capturados durante el año 2007 en los distintos cuadrantes.

3. Relación entre densidad de zancudos e incidencia de VON en gallinas centinela. Los datos de vigilancia en gallinas centinela para 2007 (Cordón-Rosales y Morales, 2008) fueron utilizados para relacionar la densidad de zancudos con la incidencia por mes de VON. Para esto, se hizo una correlación de Spearman (CI = 95%), utilizando el programa GraphPad Prism versión 5.02 Trial para Windows (GraphPad Software, San Diego, CA).

## II. RESULTADOS

### A. Análisis de ingesta sanguínea

1. Extracción de ADN de abdómenes de zancudos alimentados. Para el análisis de ingesta sanguínea se procesó 68 pools (428 individuos) de zancudos hembras (*Cx. quinquefasciatus*) alimentadas.

Se realizó un total de 19 ensayos de extracción de ADN que incluían 23 muestras de zancudos individuales por experimento. Luego de aplicar dos métodos diferentes de extracción de ADN se verificó la calidad de este mismo, utilizando un PCR específico para ADN mitocondrial (Figura 5) como se explica en la sección de metodología. Con este PCR se analizó una muestra de cada grupo de extracción. En todas las muestras probadas, se observó la presencia del producto de PCR esperado (Figura 6).

Figura 5. Optimización de pruebas de PCR ND4. M: Marcador molecular 100pb. (a) y (b) ADN de *Cx. quinquefasciatus* extraído con Kit y DNAzol, respectivamente. (c) y (d) ADN de abdómenes de zancudos alimentados, extraído con Kit y DNAzol respectivamente, (e) y (f) controles negativos sin templado (NTC); pb, pares de bases.

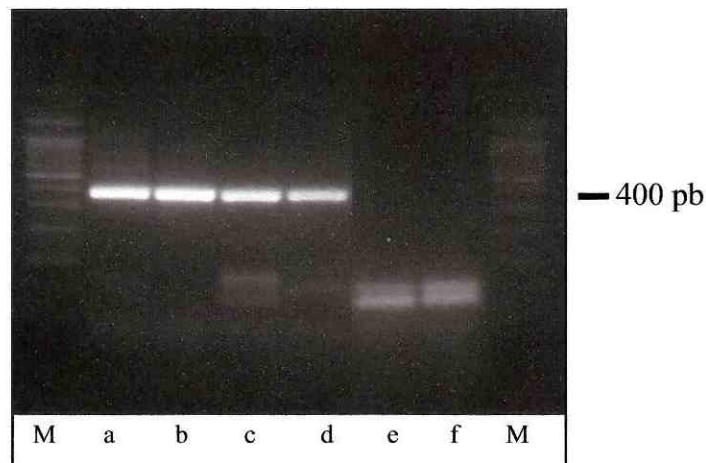


Figura 6. PCR ND4 para verificación de calidad de ADN. M, marcador molecular 100 pb; (a)-(q), (s) y (v) ADN de abdomenes de zancudos alimentados, (r) y (t) controles negativos de extracción con Kit y DNAzol, respectivamente, (u) Control negativo sin templado, NTC. pb, pares de bases

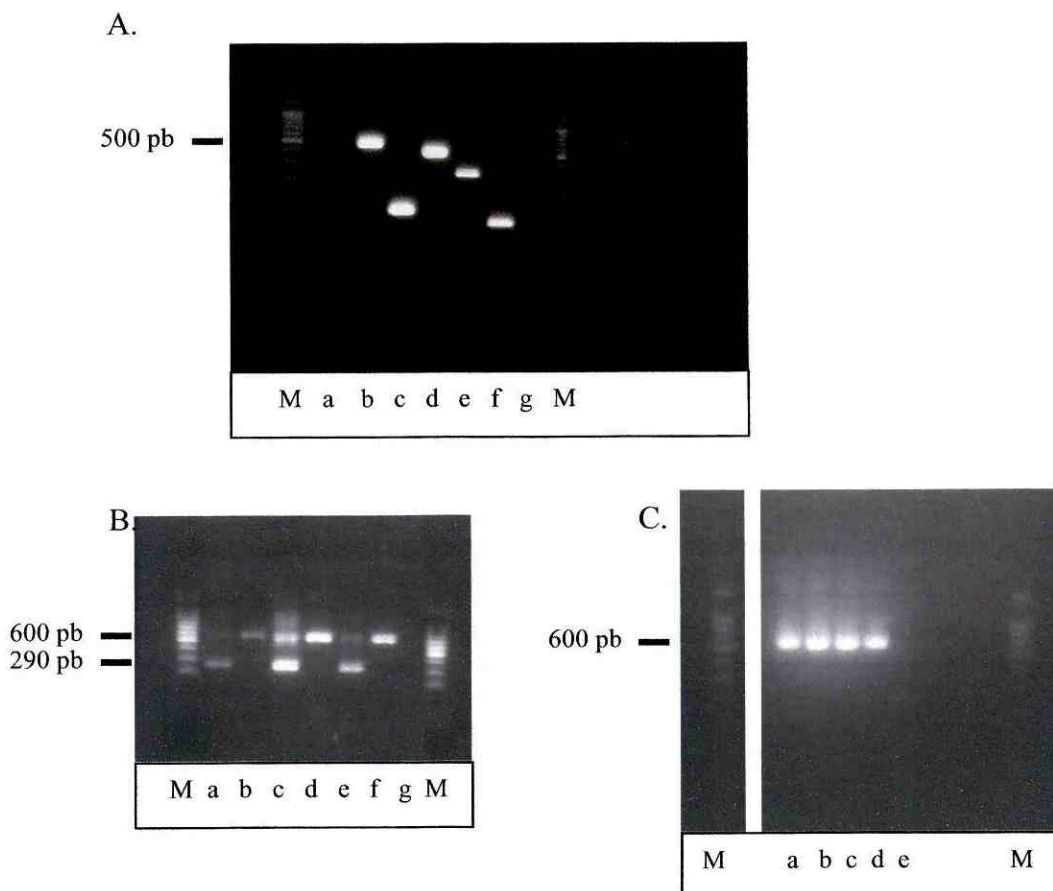


2. Identificación de hospederos. Con la estrategia de PCRs para orden y especie, explicada en la sección de metodología, se identificó el hospedero del contenido sanguíneo de 211 zancudos. Inicialmente se optimizó cada uno de los PCRs, utilizando como controles positivos ADN de cada hospedero. Como se muestra en la Figura 7, el tamaño de las bandas permite distinguir entre cada hospedero.

Los resultados obtenidos muestran que el hospedero más comúnmente identificado fue la gallina (75.4%, n=159), seguida por el perro (7.6%, n=16), el pavo, pato, gato, dos aves silvestres passerinas (*Quiscalus mexicanus* and *Turdus grayi*) y una rata (Cuadro 3).

La especie de mamífero mayormente identificada como hospedero de *Cx. quinquefasciatus* fue el perro doméstico. En total un 76.2% del total de ingestas sanguíneas derivadas de mamíferos. En este estudio, no se detectó ingestas sanguíneas derivadas de humano.

Figura 7. Optimización de pruebas de PCR para identificación de hospederos. A. PCR con cebadores específicos para especie. (b)-(e), productos de amplificación para ensayo de PCR multiplex con controles positivos de ADN con cebadores específicos para (b) *C. familiaris*, (c) *C. hircus*, (d) *B. taurus* (e) *H. sapiens*. (f) control positivo para ensayo de PCR con cebadores específicos para *G. gallus*. (a) y (g) Controles negativos sin templado. B. Ensayo de PCR con cebadores específicos para orden con primers AviFor y AviRev con controles positivos de ave (a, c, e) y mamífero (b, d, f). C. Ensayo de PCR con cebadores específicos para mamíferos con control positivo de ADN de cabra (d). (c) y (e) Controles negativos sin templado. M, marcador molecular 100 pb.



3. Patrón de alimentación de *Culex quinquefasciatus*. Como se muestra en la Figura 8 la cantidad de ingestas derivadas de aves, en su mayoría gallinas, es mayor en relación al número de ingestas obtenidas a partir de mamíferos. El resultado de la prueba de  $\chi^2$  mostró que las proporciones de ingestas sanguíneas de gallinas, perros y otros hospederos, difieren significativamente en algunos meses del año (Figura 9) ( $\chi^2=62.11$ ,  $p>0.001$ ) y entre la estación “seca” entre los meses de febrero a junio (pp media =

1.05 mm, %HR = 76.8%) y la estación "húmeda" (pp media = 3.34 mm, %HR = 80.4%) observada en los meses de julio a noviembre ( $\chi^2=19.53$ ,  $p>0.0006$ ).

Al hacer una comparación entre hábitats (urbano, peri-urbano), se observó que en ambos, la mayor proporción de ingestas sanguíneas provenía de hospederos aviares (Figura 10). Sin embargo, en cada hábitat, el patrón específico de alimentación de *Cx. quinquefasciatus* a partir de gallinas y otras aves domésticas, aves silvestres, perros y otros mamíferos fue significativamente diferente ( $\chi^2=31.26$ ,  $p<0.0005$ ). Se observó que la proporción de ingestas sanguíneas obtenidas a partir de mamíferos en los cuadrantes urbanos fue mayor y con mayor diversidad de especies. Mientras que la fuente de alimentación a partir de hospederos domésticos aviares fue más diversa en el hábitat peri-urbano (pavos, patos, gallinas).

Cuadro 3. Número y porcentaje de ingestas sanguíneas por especie identificadas de *Cx. quinquefasciatus* colectados en los cuadrantes urbanos del estudio de Foco de Transmisión, Puerto Barrios, Izabal, durante 2007

Hospedero	Total	% de orden	% del total ( $\pm$ IC)
Aves (total)	189		89.6
<i>Gallus gallus</i> (gallina)	159	84.1	75.4( $\pm$ 5.8)
<i>Meleagris gallopavo</i> (pavo común)	8	4.2	3.8( $\pm$ 2.6)
<i>Cairina moschata</i> (pato doméstico)	7	3.7	3.3( $\pm$ 2.4)
<i>Quiscalus mexicanus</i> (zanate)	3	1.6	1.4
<i>Turdus grayi</i> (cenzontle)	1	0.5	0.5
Otras <sup>1</sup>	11	5.8	5.2( $\pm$ 3.0)
Mamíferos (total)	22	100	10.4
<i>Canis familiaris</i> (perro doméstico)	16	72.7	7.6( $\pm$ 3.6)
<i>Felis catus</i> (gato doméstico)	4	18.2	1.9
<i>Rattus norvegicus</i> (rata noruega)	1	4.5	0.5
Otros <sup>2</sup>	1	4.5	0.5
Total de identificados	211		
Total de no identificados <sup>3</sup>	217		
Total de probados	428		

<sup>1</sup> Hospederos aviares para los cuales no se obtuvo una secuencia específica.

<sup>2</sup> Hospederos mamíferos para los cuales no se obtuvo una secuencia específica.

<sup>3</sup> Zancudos que no presentaron amplificación con los cebadores utilizados.

Figura 8. Densidad relativa de *Culex quinquefasciatus*, y número de ingestas sanguíneas identificadas obtenidas a partir de hospederos aviáres y mamíferos en Puerto Barrios, Izabal, durante 2007.

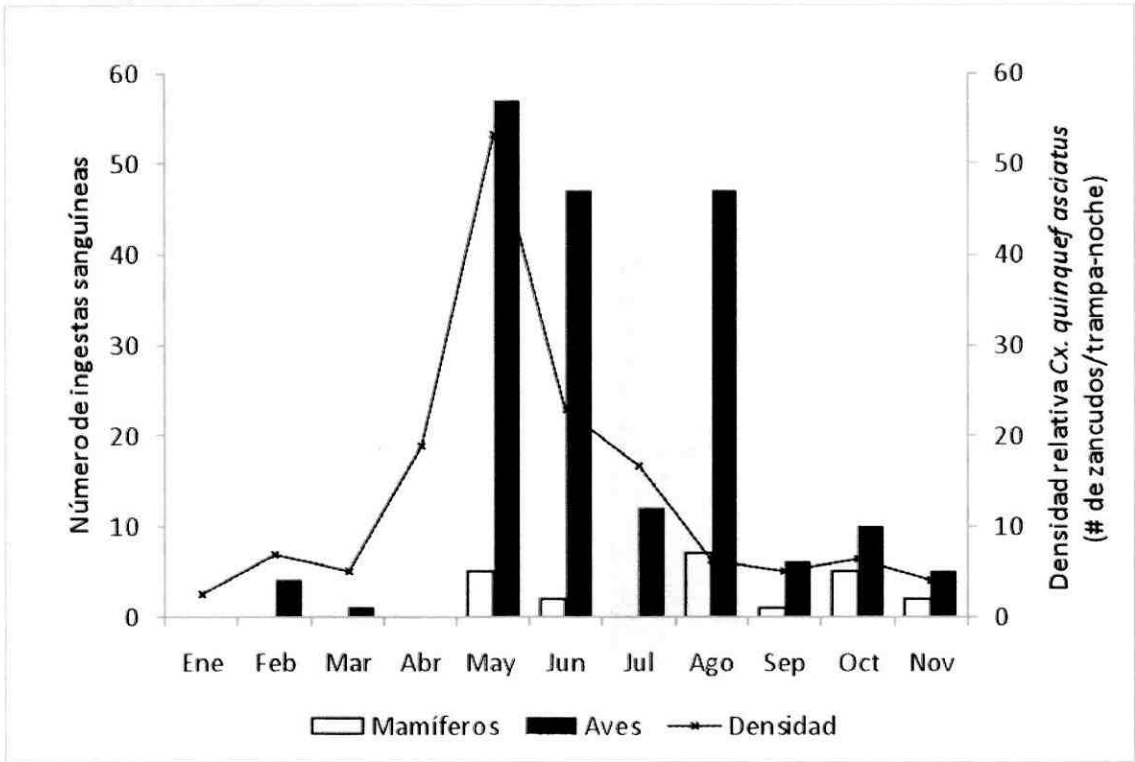


Figura 9. Proporción de ingestas sanguíneas de *Cx. quinquefasciatus* obtenidas de hospederos mamíferos y aviáres en Puerto Barrios, Izabal, durante 2007. Otros mamíferos incluyen gato doméstico, una rata y 1 mamífero no identificado; aves silvestres incluyen 1 ceniztonle y 3 zanates; otras aves domésticas incluyen pato doméstico, pavo y aves no identificadas. No se procesaron ingestas sanguíneas colectadas en abril.

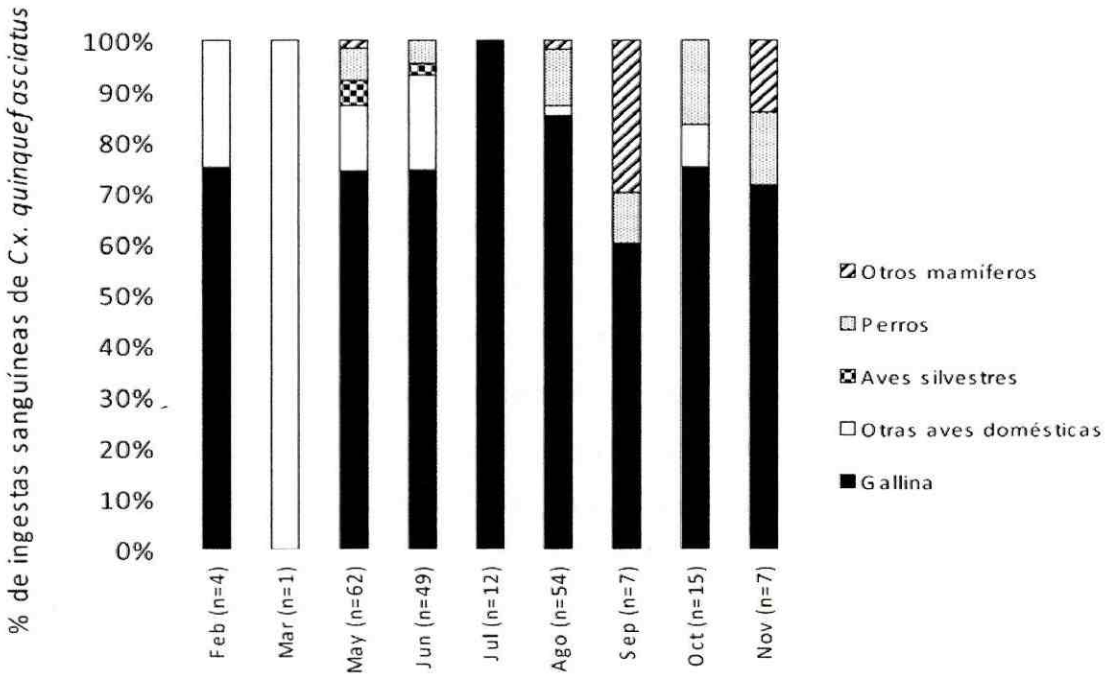
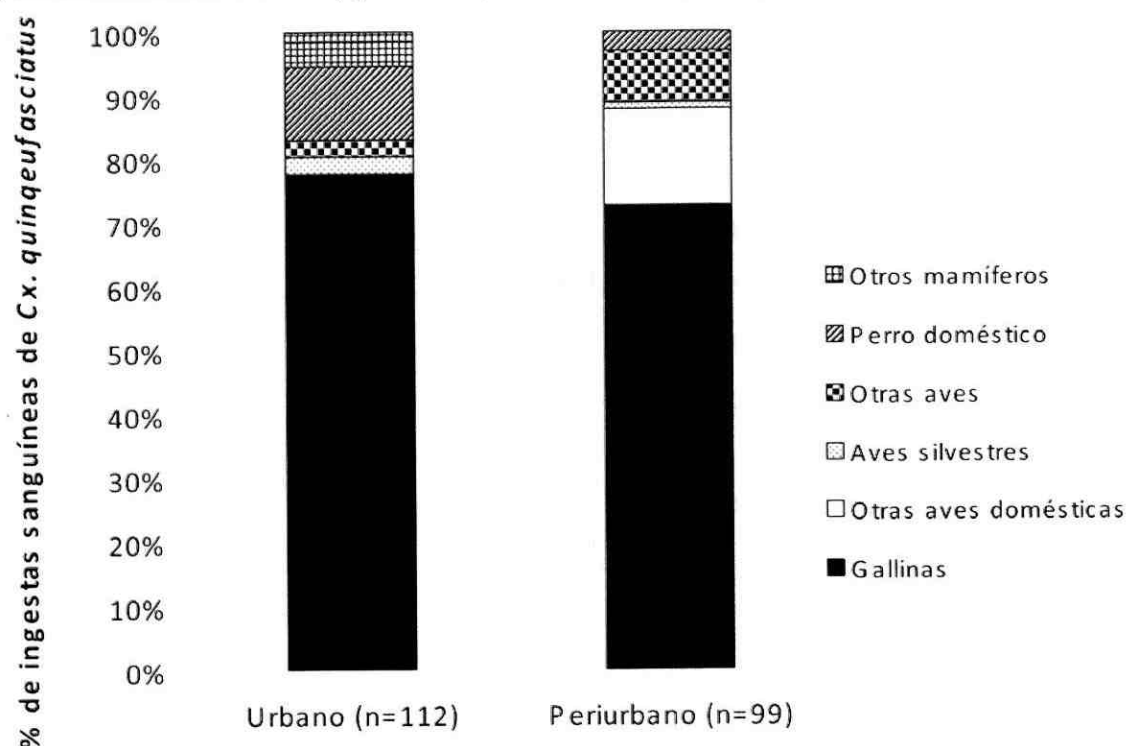


Figura 10. Proporción de ingestas sanguíneas de *Cx. quinquefasciatus* obtenidas de hospederos mamíferos y aviáres en los hábitats urbano y peri-urbano, en Puerto Barrios, Izabal, en 2007.



4. Preferencias de alimentación de *Culex quinquefasciatus*. Para el análisis de preferencia de hospederos, se utilizaron los datos de las encuestas realizadas en las localidades en las que se llevó a cabo las actividades de vigilancia de VON (ver Sección II. A. 1. a. Sitio de estudio). Es importante señalar que los datos de las encuestas no representan abundancias relativas de hospederos por lo que los datos presentados a continuación fueron comparados únicamente con base a sus intervalos de confianza. La composición de la población de humanos y animales entre los distintos sitios de captura de zancudos fue similar. Los mamíferos domésticos observados incluían perros (4% del total de vertebrados incluidos en las encuestas), gatos (5%) y en uno de los cuadrantes, dos conejos (3%). Entre las aves domésticas observadas se contaron mayormente gallinas (54%) y también patos (6%), pavos (5%), pijijes y loros (3%). Es importante mencionar que en esta zona, los conteos de aves silvestres realizados por ornitólogos demuestran la presencia de distintas especies de passerinas de las cuales las más abundantes son el zanate (*Quiscalus mexicanus*, 27%) y el cenizontle (*Turdus grayi*, 7%) (J-L Betoulle,

comunicación personal). Alrededor del 25% del total de vertebrados contados eran humanos.

Para observar si existía preferencias de alimentación relativas entre los hospederos vertebrados detectados en las ingestas sanguíneas de *Cx. quinquefasciatus*, se calculó el índice de alimentación (FI) (Cuadro 4). De acuerdo a las proporciones relativas, los índices de alimentación estimados para *Cx. quinquefasciatus*, indican que éstos tienen tendencia a preferir las gallinas como fuente de alimentación (FI>1) en comparación con el resto de hospederos aviares y algunos mamíferos. Además, hay preferencia entre los hospederos aviares por los patos y pavos en relación a las aves silvestres (zanates y cenizotes). Por otro lado, los índices de alimentación estimados para *Cx. quinquefasciatus* indican que los zancudos se alimentan preferiblemente de los perros en comparación con otros hospederos disponibles.

Cuadro 4. Índices de alimentación para *Cx. quinquefasciatus* entre especies de vertebrados.

Hospedero	Índices de alimentación (FI) entre hospederos vertebrados						
	Gallina	Pato	Pavo	Perro	Gato	Zanate	Cenzontle
Gallina	—	1.34±0.25	1.36±0.29	0.72±0.82	3.55	12.9	4.8
Pato		—	1.02±6.72	0.54±18.80	2.65	43.8	16.3
Pavo			—	0.53±16.38	2.61	43.1	16.0
Perro				—	4.95	81.7	30.3
Gato					—	16.5	6.1
Zanate						—	0.4
Cenzontle							—

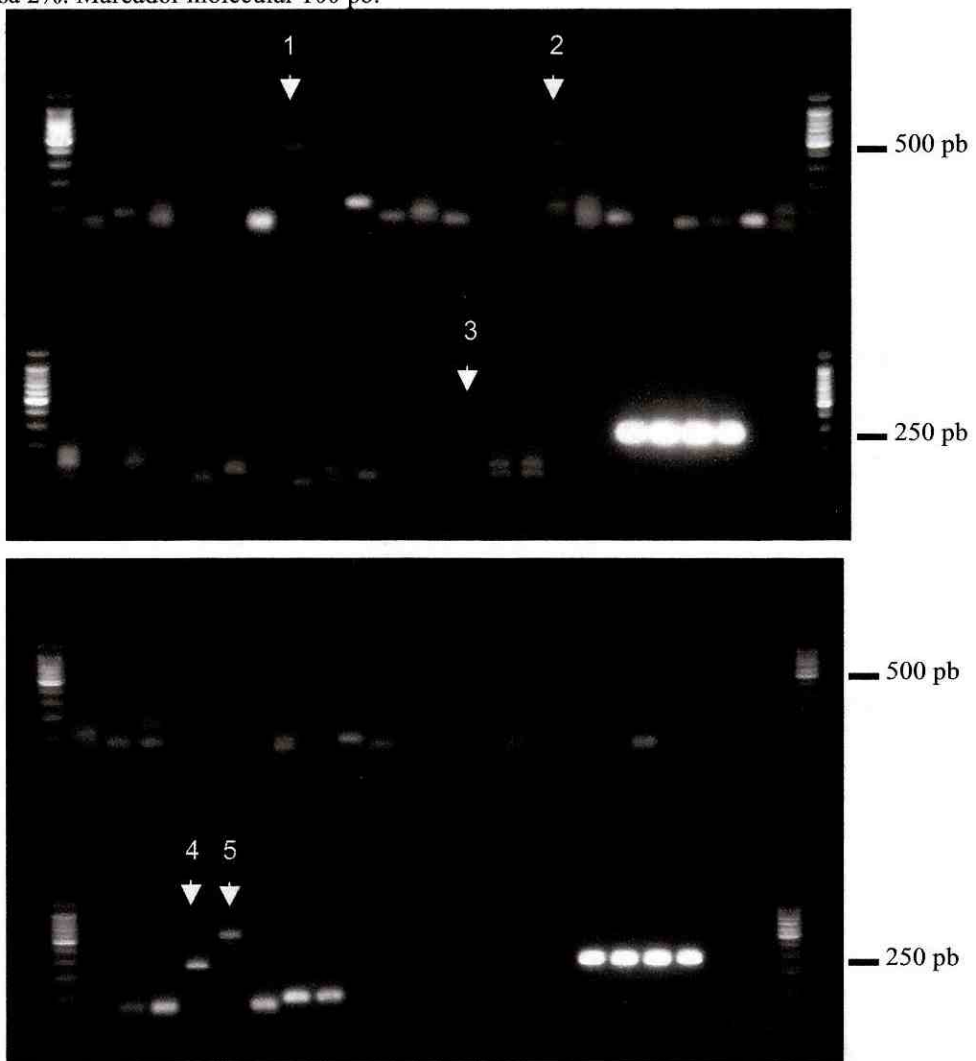
La tabla se lee a lo largo, *i.e.* los zancudos se alimentan de las gallinas 1.34 más que de los patos. Los índices de alimentación debajo de la diagonal, son el recíproco de los valores que aparecen por arriba de la diagonal. Los valores de FI se presentan con  $\pm$  IC 95% cuando aplica. El IC al 95% se presenta para aquellas especies de las que se detectó más de 5 ingestas sanguíneas.

## B. Detección VON en zancudos alimentados

1. Detección de flavivirus por RT-PCR. Para el ensayo de RT-PCR con cebadores consenso para flavivirus, se obtuvo 5 (7.3%) pools positivos de los 68 pools procesados de *Cx. quinquefasciatus* alimentados (Figura 11). Con el fin de identificar los flavivirus presentes en los pools positivos obtenidos en el ensayo de RT-

PCR para flavivirus se realizaron pruebas complementarias, para esto, los pools fueron enviados a la Dra. B.W. Johnson del laboratorio de Diagnóstico y Referencia ADB/DVBID-CDC, Fort Collins. Los resultados de las pruebas moleculares realizadas en dicho laboratorio se muestran en el Cuadro 5. En dos de estos pools se detectó la presencia de ARN del flavivirus CxFV Izabal 2006 aislado anteriormente de zancudos de esta especie colectados en el año 2006 en la misma localidad (Morales-Betoulle *et al.*, 2008). La tasa de infección (MLE) por CxFV Izabal 2006 de *Cx. quinquefasciatus* en el area urbana de Puerto Barrios estimada fue de  $0.52 \cdot 1000$  zancudos.

Figura 11. Productos de RT-PCR obtenidos con cebadores concenso para flavivirus a partir de ARN de pools de zancudos *Culex quinquefasciatus* alimentados, colectados durante 2007, en Puerto Barrios, Izabal. Gel de agarosa 2%. Marcador molecular 100 pb.



Cuadro 5. Resultados de los ensayos de RT-PCR a partir ARN de pools de zancudos *Culex quinquefasciatus* alimentados, colectados durante 2007, en Puerto Barrios, Izabal

No. de Pool <sup>1</sup>	Mes de colecta	Tipo de Cuadrante	RT-PCR Flavivirus <sup>2</sup>		Resultados ADB/DVBID-CDC <sup>3</sup>		
			Tamaño de producto	Tm (°C)	TaqMan CxFV (Ct) <sup>4</sup>	Flavivirus <sup>5</sup>	Alphavirus
-01203	Mar.	Peri-urbano	~ 450 pb	86.5	-	-	-
-01897	May.	Urbano	~ 450 pb	82.5	+ (33)	-	-
-02390	Ago.	Peri-urbano	~ 200 pb	64.5	+ (24)	+	-
-11503	Nov.	Urbano	~ 200 pb	78.5	-	-	-
-11548	Nov.	Peri-urbano	~ 650 pb	88.0	-	-	-

<sup>1</sup>Código de identificación.

<sup>2</sup>Ensayo de RT-PCR con cebadores concenso para flavivirus FU2 y cFD3.

<sup>3</sup>Resultados Laboratorio de Referencia ADB/DVBID-CDC (Dr B.W. Johnson, comunicación personal).

<sup>4</sup>Ensayo de RT-PCR en tiempo real con sonda TaqMan específico específico para CxFV Izabal 2006.

<sup>5</sup>Ensayo de RT-PCR de punto final con cebadores específicos para Flavivirus, dinsintos de FU2 y cFD3.

pb, Pares de bases. Tm, temperatura de hibridización del producto amplificado. CxFV, *Culex* Flavivirus. Ct, Umbral de ciclo ("Cycle threshold" por sus siglas en inglés).

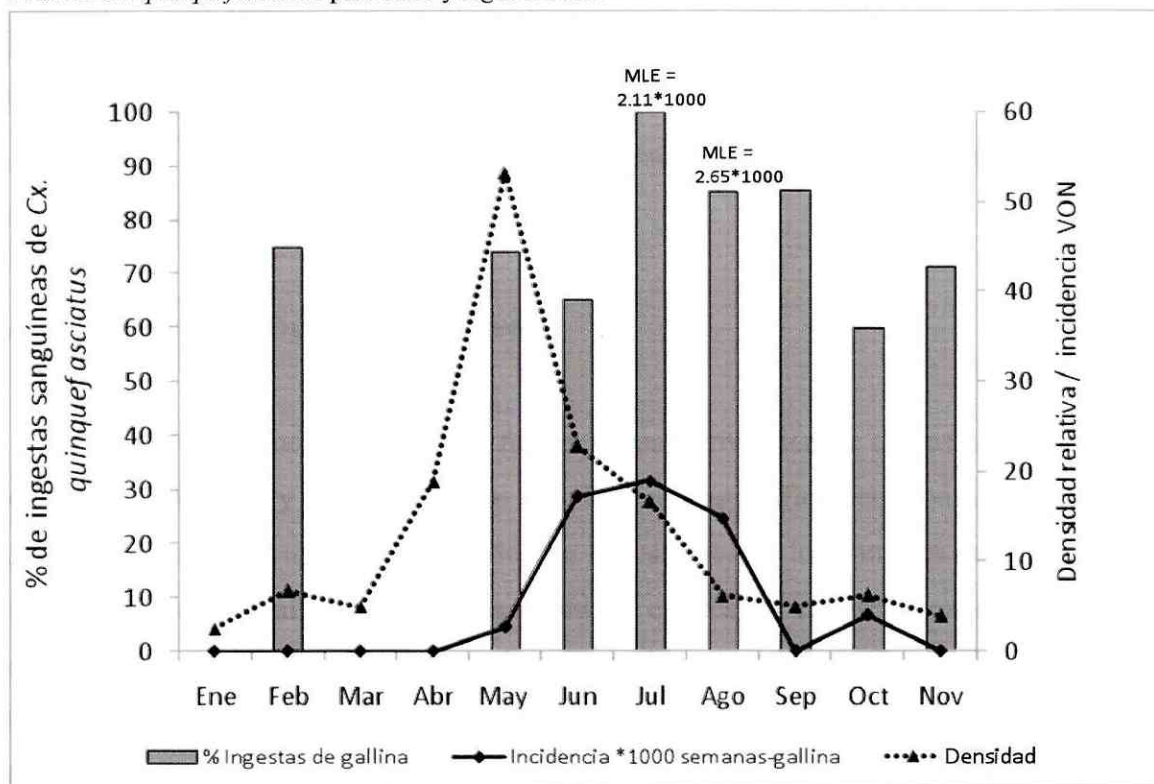
2. Detección de VON por RRT-PCR. No se logró amplificar el genoma del VON en ninguno de los pools de hembras alimentadas de zancudos *Culex quinquefasciatus* por el ensayo de PCR de transcripción reversa en tiempo real TaqMan.

3. Tasa de infección (MLE) por VON en *Culex quinquefasciatus*. Utilizando datos obtenidos por el equipo de vigilancia de VON en el Foco de transmisión realizada en paralelo a este estudio, se determinó la tasa de infección de VON para *Cx. quinquefasciatus* del año 2007. Esta tasa fue de  $MLE = 2.11 \cdot 1000$  para el mes de julio y  $MLE = 2.65 \cdot 1000$  para el mes de agosto. Estos valores fueron calculados con base a los aislados virales realizados a partir de 2 pools colectados en las colectas masivas en estos mismos meses.

C. Relación entre patrón de alimentación e incidencia de VON en gallinas centinela. Se observó que existe una correlación positiva, aunque no significativa, entre los cambios en la densidad relativa de la población de *Cx. quinquefasciatus* y la incidencia de VON en las gallinas centinela (Figura 12). Como se muestra en esta misma figura, aproximadamente 1 a 2 meses después del pico de la densidad de zancudos, se observa un pico de incidencia del virus en las gallinas centinela. La proporción de ingestas sanguíneas de gallina es elevada en los mismos meses y sitios. Estos eventos

(aumento de densidad de zancudos y seroconversiones) sucedieron durante los meses en los que se detectó zancudos *Cx. quinquefasciatus* infectados por VON.

Figura 12. Relación entre la proporción de ingestas sanguíneas de *Cx. quinquefasciatus* obtenidas de gallinas, densidad de zancudos e incidencia de VON en gallinas centinela. MLE = tasa de infección por VON en *Cx. quinquefasciatus* para Julio y Agosto 2007.



### III. DISCUSIÓN

El objetivo primario de este trabajo de investigación fue estudiar la fuente de alimentación sanguínea de una de las especies de zancudos más abundante en el área urbana de un foco de transmisión de VON identificado recientemente en la costa Caribe de Guatemala. Esto, con el fin de conocer la relación entre los potenciales vectores y hospederos de esta localidad en donde pese a la evidencia de la circulación del virus, aún no se conoce con exactitud las especies involucradas en su transmisión. A continuación se discuten los resultados de esta investigación.

#### A. Análisis de Ingesta sanguínea

Este estudio fue realizado de forma retrospectiva dentro de las actividades de vigilancia del VON y por lo tanto no fue diseñado específicamente para el estudio de preferencias de alimentación. Es sabido que los estudios de los patrones de alimentación a veces proveen resultados desviados debido a errores en el diseño experimental. Sin embargo, estos errores se pueden minimizar cuando se realizan colectas durante toda la temporada, en distintos hábitat y con distintos tipos de trampas (Niebylski y Meek 1992). Es por esta razón que en este caso se trabajó con los zancudos colectados con los dos distintos tipos de trampas (CDC y Grávida) sin hacer ninguna diferenciación en cuanto al método de colecta.

1. Control de calidad del ADN extraído. Debido a su disponibilidad, se utilizó dos distintos métodos de extracción de ADN. Ambos métodos están basados en el uso de detergentes de guanidina, para la obtención de ADN a partir de tejidos o sangre. El ensayo de PCR ND4 utilizado en este caso para verificar la calidad del ADN extraído, fue un método desarrollado originalmente para la determinación de relaciones filogenéticas entre distintos taxones. Este ensayo permite la detección de ADN mitocondrial de distintas especies de zancudos, por ejemplo, del género *Culex*, debido a los segmentos de secuencias conservadas de este gen. Es por esta razón, que en este caso

el ensayo puede ser utilizado como un control interno o de calidad en las muestras de zancudos.

De forma cualitativa, no se observó diferencia entre la calidad de ADN obtenida con los diferentes métodos de extracción, sin embargo, se observó distinto tamaño de bandas en el ADN extraído de una muestra que fue procesada con un grupo de muestras maceradas con balín de cobre y no con pistilo plástico. La región del genoma de *Cx. quinquefasciatus* que amplifica el par de cebadores para el PCR ND4 puede presentar variación entre individuos y por lo tanto visualizarse como polimorfismo en el gel de agarosa, otra explicación para esto puede ser que el procesamiento con balín de cobre, haya producido degradación parcial del ADN y por lo mismo, no se observó una banda clara en los resultados de la electroforesis en gel de agarosa. Como una recomendación, se sugiere que el tejido abdominal de los zancudos se macere siempre con pistilo de plástico. En la Figura 6 (línea t) se observa producto de amplificación en el control negativo de extracción. Sin embargo, al repetir dos veces más el análisis, esta amplificación no fue reproducible en el control negativo. Por otro lado, en los análisis de ingesta sanguínea, ningún control negativo presentó amplificación.

2. Identificación de hospederos. La estrategia molecular utilizada para la identificación de hospederos a partir del contenido de los abdómenes de las hembras de *Cx. quinquefasciatus* alimentadas, permitió realizar de forma relativamente rápida la caracterización de las ingestas sanguíneas. En relación al porcentaje de ingestas identificadas (aproximadamente 50%) han de considerarse diversos factores que pueden influir en el éxito de la identificación molecular. Por ejemplo, factores propios del ensayo de amplificación (si el tamaño del producto de amplificación esperado es un fragmento muy grande es más susceptible a ser degradado según la forma en que se manipule la muestra).

Por otro lado, se encuentran los factores inherentes de la muestra como lo son la presencia de una ingesta visible (*i.e.* el volumen de la ingesta sanguínea) y por tanto, la cantidad de ADN obtenido a partir de dicha ingesta. Durante el proceso de disección y

macerado de abdómenes, se observó que no todos los zancudos procesados presentaban un volumen de ingesta sanguínea visible, por lo que la proporción de muestras identificadas puede deberse en parte, a este factor. El método de conservación (seco, fresco o congelado) y el grado de digestión de la ingesta sanguínea también influyen en el éxito de la identificación molecular (Mukabana *et al.* 2002). En este caso, no se observó ninguna diferencia en la calidad del ADN obtenido en relación al método de conservación (deshidratado en sílica o congelado). Por su parte, el uso de distintas estrategias de detección es una forma de lidiar con estos problemas. Por ejemplo, el uso de distintos pares de cebadores que permitan la amplificación de distintos segmentos conservados del genoma mitocondrial. Entre estos puede incluirse otros pares de cebadores específicos que amplifiquen no sólo para aves y mamíferos sino también para otros órdenes de vertebrados –*i.e.* reptiles y anfibios– así como para otras especies de hospederos –gatos, cerdos, caballos, roedores, pavos, etc–. Por su parte, el uso de herramientas de secuenciación de ADN puede ayudar a complementar los resultados de los ensayos de PCR, al aumentar el rango de especies de posibles hospederos a ser detectados así como para la detección de ingestas sanguíneas mixtas (*i.e.* aquellas obtenidas a partir de distintas especies de hospederos) luego de la clonación de fragmentos amplificados con secuencias ambiguas. De hecho, en este estudio, fue a través de la secuenciación que se pudo identificar a especies que no estaban incluidas en los ensayos de PCR y con esto aumentar el porcentaje de ingestas identificadas. El conjunto de datos puede ser analizado junto con otros factores como disponibilidad de hospederos, época del año, etc. para definir patrones de alimentación de los zancudos.

3. Patrón de alimentación de *Cx. quinquefasciatus*. Se ha determinado que no solo las condiciones ambientales sino también el trasfondo genético de la especie podría influir en el comportamiento alimenticio de *Cx. quinquefasciatus* (Kilpatrick *et al.* 2007). Algunos autores han atribuido a la densidad relativa de los hospederos, la variación local de las preferencias de alimentación sanguínea. Sin embargo, otros autores proponen que dichas variaciones también pueden ser causadas por cambios estacionales en las preferencias de hospederos (Niebylski y Meek, 1992). Se ha observado que el rango de hospederos de *Cx. quinquefasciatus* es variable y puede

comprender aves, mamíferos e incluso reptiles (Apperson *et al.* 2004, Irby y Apperson 1988).

Los datos obtenidos de estudios realizados en la India, Singapur y Bornea, y algunas localidades del Este de África sugieren que el hospedero preferido por esta especie es el humano (Tempelis 1975). Estos resultados difieren en su mayoría con los resultados obtenidos para *Cx. quinquefasciatus* en localidades del hemisferio occidental. Un estudio previo realizado en dos localidades de Hawaii, sugiere que en una de las localidades el hospedero principal de *Cx. quinquefasciatus* es el perro, mientras que en la otra localidad, principalmente aves (Hess y Hayes, 1970). Otros estudios posteriores en este mismo sitio reportan que *Cx. quinquefasciatus* se alimenta principalmente de aves, pero también de un amplio rango de hospederos mamíferos incluyendo humanos (Tempelis *et al.* 1970). Las especies del complejo *Culex pipiens*, en el este de los Estados Unidos, incluyendo Tennessee (Savage *et al.* 2007), obtenían su ingesta sanguínea principalmente de aves, en particular de Passerinas (Apperson *et al.* 2004). Sin embargo, en el ambiente urbano de un estudio realizado en Luisiana, EE.UU. el hospedero principal de *Cx. quinquefasciatus* fue el perro, seguido de Passeriformes y humanos (Niebylski y Meek, 1992). Recientemente, un estudio realizado en Arizona, sugiere que aunque *Cx. quinquefasciatus* en esta región se alimenta tanto de mamíferos como de aves, la proporción de ingestas obtenidas a partir de humanos es mínima (Zinser *et al.* 2004). Finalmente, resultados obtenidos para el estado de Texas concluyen que *Cx. quinquefasciatus* es oportunista en cuanto a sus hábitos alimenticios, y que presenta variación estacional en su preferencia hacia hospederos mamíferos y aviares (Molaei *et al.* 2007). En América Latina, en Brazil, se determinó que la tendencia de *Cx. quinquefasciatus* por alimentarse de humanos fue mayor en relación a otras especies de hospederos vertebrados domésticos (gallinas, ganado, perros y caballos) (Gomes *et al.* 2003). En México, se determinó que los zancudos *Cx. quinquefasciatus* de Monterrey, bien adaptados a las condiciones urbanas, presentan preferencia por gallinas, seguida de humanos, y otros hospederos mamíferos (perros, gatos, cerdos, caballos) (Elizondo-Quiroga *et al.* 2006). Como puede observarse con todos estos estudios, el

comportamiento alimenticio de *Cx. quinquefasciatus* es oportunista y varía según la localidad geográfica.

En este estudio, los datos demuestran una tendencia de alimentación ornitofílica de *Cx. quinquefasciatus* en los sitios de colecta. Este resultado coincide con los resultados obtenidos para esta misma especie en el estudio de preferencias de alimentación de potenciales vectores de VON realizado en esta localidad (Kent 2008). En dicho estudio la colecta de zancudos se realizó con aspirador automático y las colectas se hicieron directamente de la vegetación y de contenedores de reposo. Más del 90% de las ingestas sanguíneas de *Cx. quinquefasciatus* (n= 166) provenían de gallinas, también se detectó 1 hospedero bovino, 1 humano, 11 perros y un pavo (R. J. Kent, comunicación personal).

En relación al patrón de alimentación de *Cx. quinquefasciatus* determinado por este estudio, los resultados de las pruebas de  $\chi^2$  sugieren que existe variación a lo largo del año. Sin embargo, se debe tomar en cuenta que aunque en algunos meses (febrero, marzo y julio) el 100% de las ingestas provenía de hospederos aviares, el tamaño de la muestra para dichos meses era muy pequeño (1 a 12 individuos) y en otros meses no se disponía de zancudos alimentados. Por ejemplo en el mes de marzo solo se lograron identificar 3 ingestas, todas provenientes de pavos. Por lo tanto hay que ser cuidadoso al considerar este resultado como un verdadero cambio en las preferencias de alimentación de *Cx. quinquefasciatus* a lo largo del año. A sí mismo, hay que considerar que en este estudio únicamente se identificó a hospederos aviares y mamíferos. Otros animales que habitan en el lugar que no fueron incluidos en las encuestas (roedores, reptiles y anfibios -iguanas, lagartijas, ranas, etc.-) han sido identificados en ingestas sanguíneas de *Cx. quinquefasciatus* en otros estudios. Por otro lado, se debe considerar que los cambios a lo largo del año, así como el comportamiento ornitofílico pueden estar relacionados e influidos por la composición de la población de hospederos en los sitios en donde se realizaron las colectas (*i.e.* ambiente peri-urbano y urbano). Por ejemplo, aunque en este estudio se observó que la tendencia ornitofílica fue una característica en ambos hábitats, los resultados sugieren que existe diferencia entre la proporción de ingestas sanguíneas

derivadas de hospederos mamíferos y aviáres entre los dos tipos de hábitat, siendo la proporción de ingestas sanguíneas derivadas de mamíferos significativamente mayor en el hábitat peri-urbano respecto al urbano. Posiblemente la variación de las preferencias entre los distintos meses del año y por hábitat sea más bien, un reflejo de la variación de la disponibilidad de hospederos. Para aclarar esto es necesario completar estos datos con colectas en otros hábitats o nichos ecológicos (dormideros de aves, hábitat rural, ambiente intradomiciliar) en donde la composición de la población sea diferente, para determinar si la tendencia ornitofílica es o no un comportamiento inherente de la especie. Por su parte, la colecta de datos de distribución y disponibilidad de hospederos (densidades y no proporciones) a lo largo de todo el año, sería muy valiosa.

A pesar de que en este estudio no se detectaron ingestas sanguíneas en *Cx. quinquefasciatus* provenientes de humanos, no se puede excluir la posibilidad de que el humano sea un hospedero de esta especie. Para determinar esto podría realizarse colectas dentro de los domicilios. *Culex quinquefasciatus* es una especie con actividad nocturna, por lo cual los humanos están en riesgo de ser picados por este zancudo durante la noche (Anderson *et al.* 2007), mientras duermen o permanecen dentro de sus casas. El uso de barreras de protección (uso de mallas y mosquiteros, humo etc.), podría reducir el grado de exposición de las personas a la picadura de este zancudo. Sin embargo, en Puerto Barrios, la estructura de la mayoría de las casas es abierta y la utilización de estas barreras es relativamente reducida. En estudios posteriores será necesario incluir las colectas intradomiciliares para completar estos datos y determinar si *Cx. quinquefasciatus* se alimenta de humanos en esta localidad.

Además de modificar la forma de colecta de los zancudos, también es importante que la estrategia utilizada para la identificación de las ingestas sanguíneas permita la detección de ingestas mixtas (de distintas especies de hospederos). En efecto, se ha propuesto, que la alimentación de múltiples hospederos puede aumentar el riesgo y la tasa de transmisión de un virus como el VON (Arunachalam *et al.* 2005, Kilpatrick *et al.* 2005, 2006a y b). Por ejemplo, si un zancudo se alimenta primero de un ave y luego completa su ingesta sanguínea alimentándose de un humano. En este estudio, algunas de

las ingestas sanguíneas no pudieron ser identificadas a nivel de especie debido a que las secuencias obtenidas presentaban patrones de secuencias mixtas. Es por esto que para estudios posteriores se sugiere la utilización de otras herramientas moleculares (clonación y secuenciación) para identificar este tipo de ingestas.

## B. Detección de flavivirus y VON en *Cx. quinquefasciatus* alimentados

A pesar de que los resultados preliminares sugerían la presencia de flavivirus en cinco pools de zancudos alimentados, ninguno de estos resultó positivo con la prueba específica para VON. Sin embargo, dos pools fueron positivos para el virus CxFV Izabal 2006, detectado y aislado por primera vez el año anterior en Puerto Barrios (Morales-Betoulle *et al.* 2008). El virus fue detectado en pools colectados en distintos meses del año (Cuadro 5), demostrando que el virus circula en la población de *Cx. quinquefasciatus* por segundo año luego de su detección. Por lo tanto, podría pensarse que este virus se mantiene en la población a través de transmisión vertical año con año. A sí mismo, estos resultados demuestran que zancudos con ingesta sanguínea están infectados con otro flavivirus distinto del VON. El efecto de esta infección en el zancudo en la transmisión del VON aún no se conoce.

Aunque no se detectó VON en los zancudos alimentados analizados en este estudio, el equipo de vigilancia de VON en el foco de transmisión si obtuvo dos aislados virales a partir de zancudos *Cx. quinquefasciatus* no alimentados colectados el mismo año (2007). Los hospederos identificados en las ingestas sanguíneas están expuestos a la picadura de los zancudos, por lo tanto, se asume que algunos de ellos podrían actuar como reservorio y otros como hospederos incidentales del virus encontrado en estos zancudos.

## C. Relación entre patrón de alimentación de *Cx. quinquefasciatus* e incidencia de VON en hospederos vertebrados

Como se discutió anteriormente, los índices de alimentación determinados en este estudio (Cuadro 4) sugieren que el perro es uno de los hospederos preferidos por *Cx.*

*quinquefasciatus* como fuente de ingesta sanguínea. En 2005, cuando ya se había detectado por serología la circulación de VON en Izabal, se recolectaron 32 muestras de suero canino y se probaron por la prueba para VON de ELISA de bloqueo. El 40% de las muestras presentaba anticuerpos contra el virus (M. E. Morales-Betoulle, datos no publicados). Esta evidencia serológica indica que los perros debieron infectarse por el virus, probablemente a partir de la picadura de zancudos infectados. En conjunto estos resultados sugieren que *Cx. quinquefasciatus* podría estar implicado en la transmisión del VON a los perros de Puerto Barrios. Sin embargo, a la fecha ningún estudio ha demostrado que los perros jueguen un papel importante en el ciclo de transmisión del VON, pues no son hospederos amplificadores y tampoco desarrollan enfermedad (Austgen *et al.* 2004).

En el caso de las gallinas los resultados del análisis de ingesta sanguínea derivados del estudio sugieren que estos animales son otro de los hospederos preferidos por *Cx. quinquefasciatus*. Por su parte la serología (seroconversiones) demuestra la infección por VON en las gallinas. Esto sugiere que *Cx. quinquefasciatus* es un buen candidato vector de VON para estas aves en esta localidad.

Como se mencionó en la sección de antecedentes, para poder incriminar a una especie determinada como vector de un virus se requiere que: (a) la especie sea relativamente abundante en el sitio, (b) se obtenga aislados del virus (VON en este caso) de la especie candidata, (c) se demuestre que la especie candidata se alimenta del potencial hospedero y (d) se demuestre la competencia vectorial de la especie (en laboratorios especializados bajo condiciones controladas).

Con las colectas mensuales realizadas con las trampas CDC de luz y grávida, en Puerto Barrios, se ha estimado que *Cx. quinquefasciatus*, en relación a las otras especies de zancudos del género *Culex*, es la segunda más abundante en el foco de transmisión y la más abundante dentro del área urbana. Así también, fue una de las especies a partir de las cuales se obtuvo aislados virales en el mismo año de este estudio. En este caso se cumplen las condiciones (a) y (b), es decir al menos 2 de las 4 estipuladas.

Aunque los resultados del estudio sugieren que *Cx. quinquefasciatus* es un vector potencial del VON en Puerto Barrios, es necesario recordar que para completar el ciclo de transmisión se requiere tanto de un zancudo vector como de un hospedero reservorio (amplificador). En el caso del VON, son las aves silvestres, en particular las passerinas, los principales reservorios amplificadores (Komar 2003). Las encuestas serológicas de aves silvestres sugieren que las passerinas *Turdus grayi* (cenzontle) y *Quiscalus mexicanus* (zanate) podrían ser hospederos amplificadores del VON en Puerto Barrios (Morales-Betoulle *et al.* 2007). En este estudio, únicamente el 2% de las ingestas sanguíneas identificadas provenían de estas especies. Una posible explicación de este resultado es que el tipo de colecta peridomiciliar utilizado en este estudio podría modificar el porcentaje de ingestas sanguíneas derivadas de aves silvestres. Sin embargo, aunque las gallinas no son consideradas hospederos amplificadores, no se puede excluir que los pollos muy jóvenes o inmunocomprometidos también puedan ser competentes para amplificar el VON en Puerto Barrios. De hecho, algunos autores han demostrado experimentalmente que los pollos jóvenes pueden desarrollar viremias lo suficientemente elevadas para infectar un zancudo (Sardelis 2001). En este estudio se hipotetiza entonces que en Puerto Barrios, el VON podría ser transmitido por los zancudos *Cx. quinquefasciatus* a las gallinas y pollos jóvenes, y que éstos últimos a su vez podrían actuar como hospederos amplificadores del VON. Una hipótesis alternativa es que en un ecosistema complejo como el de Puerto Barrios (área tropical) varias especies de aves (zanates, cenzontles, pollos jóvenes) y zancudos (*Cx. quinquefasciatus* y otras especies) estén contribuyendo al ciclo de transmisión del virus. Para confirmar la identidad del hospedero a partir del cual *Cx. quinquefasciatus* adquiere la infección por VON y si esta especie es capaz de transmitirlo a los potenciales hospederos, es indispensable realizar los experimentos de laboratorio de competencia tanto vectorial como de reservorios. Éste debe ser uno de los siguientes pasos para completar esta investigación.

Como se discutió anteriormente, a pesar que los zancudos *Cx. quinquefasciatus* de los sitios de estudio se alimentan en gran parte de gallinas, también se observó que pueden alimentarse, o incluso preferir, otros hospederos vertebrados. Si bien existe

evidencia serológica de la presencia de VON en aves y equinos de Guatemala desde 2004, a la fecha no se ha confirmado ningún caso de transmisión de VON a humanos. Una posibilidad para explicar la ausencia de casos humanos de VON (circulando en gallinas y zancudos) es que los zancudos *Cx. quinquefasciatus* tengan preferencia por alimentarse de otros hospederos distintos de humanos. Para apoyar esta hipótesis se deben realizar más estudios. Por ejemplo, es necesario estudiar por más tiempo el comportamiento general (incluyendo hábitos de alimentación) de esta y otras especies de zancudos *Culex* que pudieran ser vectores puente entre las aves y los mamíferos, una especie candidata es *Culex nigripalpus* que se alimenta de aves y mamíferos en proporciones similares (Kent, datos no publicados). En efecto, se ha demostrado que existen variaciones en cuanto al comportamiento de zancudos vectores de arbovirus en función de diferentes factores como por ejemplo: estaciones del año, precipitación pluvial, temperatura, humedad que pueden influir en el riesgo de transmisión a la población humana (Smith *et al.* 2004). Este tipo de estudio es complejo y requiere un tiempo considerable (años) para poder comprender la dinámica de la transmisión de arbovirus. Por su parte, Izabal es un área endémica de Dengue, por lo que también es necesario estudiar a fondo los casos febriles en humanos con sintomatología similar a este virus, ya que éstos podrían eventualmente deberse a una infección por VON.

Un factor a considerar para el estudio de una zoonosis en el país, y específicamente en Puerto Barrios, es que las personas viven en estrecho contacto con diferentes animales. Algunos autores sugieren que la presencia de múltiples fuentes de alimentación para los zancudos vectores, podría disminuir la posibilidad que un zancudo infectado por un arbovirus se alimente de un humano. Esta forma de “protección” se conoce como zooprofilaxis (Hess y Hayes 1970; Saul 2003). En el caso de Izabal, al menos en las casas del estudio incluyendo el hábitat rural, la mayoría de personas tienen además de gallinas, otros animales (pavos, patos, perros, gatos, caballos, ganado, cerdos, conejos) y viven en áreas en donde la diversidad de aves silvestres es relativamente alta. Este es otro factor que puede influir en la “inaparente” transmisión del VON a humanos en esta localidad, este efecto se conoce como efecto dilución (Swaddle & Calos 2008). A este respecto, es necesario investigar cuales especies de zancudos prefieren alimentarse de los humanos en

estos sitios, y luego determinar cuál de estas especies es competente para transmitir el virus. Desde esta perspectiva, es indiscutible que aún quedan muchos estudios por hacer para comprender la dinámica de transmisión de un arbovirus como el VON. Estos estudios son importantes ya que si en algún momento este tipo de virus llegara a convertirse en un problema de salud pública, la información generada podrá ser utilizada para determinar factores de riesgo y establecer medidas de control pertinentes. A su vez, el conocimiento generado por estas investigaciones llevadas a cabo en zonas tropicales, puede ser utilizado en otras regiones del mundo con características similares.

## IV. CONCLUSIONES

- A. Los zancudos *Cx. quinquefasciatus* colectados durante el año 2007 en el ambiente doméstico de un foco de transmisión de virus del Oeste del Nilo, localizado en Puerto Barrios, Izabal, presentan un comportamiento ornitofílico en cuanto a sus preferencias de alimentación a partir de hospederos aviares y mamíferos.
- B. Los patrones de alimentación de *Cx. quinquefasciatus* colectados durante el año 2007 en el ambiente doméstico de un foco de transmisión de virus del Oeste del Nilo, localizado en Puerto Barrios, Izabal, varían con respecto al hábitat (urbano y peri-urbano).
- C. Los zancudos de *Cx. quinquefasciatus* colectados durante el año 2007 en el ambiente doméstico de un foco de transmisión de virus del Oeste del Nilo, localizado en Puerto Barrios, Izabal, presentan preferencia hacia gallinas sobre otros hospederos.
- D. Los zancudos de *Cx. quinquefasciatus* colectados durante el año 2007 en el ambiente doméstico urbano de un foco de transmisión de virus del Oeste del Nilo, localizado en Puerto Barrios, Izabal, presentan preferencia hacia los perros sobre otros hospederos mamíferos.
- E. El flavivirus de insectos CxFV Izabal 2006 se detectó en la población de zancudos *Cx. quinquefasciatus* de Puerto Barrios en 2007, con una tasa de infección de  $0.52 \cdot 1000$  zancudos.
- F. La tasa de infección por VON estimada en zancudos *Cx. quinquefasciatus* de Puerto Barrios del año 2007 fue de  $2.11 \cdot 1000$  zancudos para el mes de julio y  $2.65 \cdot 1000$  zancudos para el mes de agosto.
- G. La incidencia de VON en las gallinas centinela en el foco de transmisión de Puerto Barrios, Izabal, a lo largo del año 2007 parece estar relacionada con el número de ingestas sanguíneas de *Cx. quinquefasciatus* provenientes de gallina.
- H. La especie de zancudos *Cx. quinquefasciatus* de Puerto Barrios Izabal, es una especie vector potencial del virus del Oeste del Nilo en esta localidad.

## V. RECOMENDACIONES

- Se recomienda el uso de los resultados obtenidos con este estudio para el diseño de otros estudios retrospectivos de las preferencias alimenticias en otras especies de zancudos vectores, en la localidad del estudio.
- Se recomienda que las técnicas de laboratorio empleadas en este estudio sean utilizadas para el estudio de los patrones de alimentación de otras especies de zancudos vectores potenciales, en la localidad del estudio.
- Para el diseño de estudios de patrón de alimentación de zancudos vectores y otras especies de artrópodos hematófagos se recomienda agregar colectas en otros hábitats (intradomiciliares, nichos ecológicos diferentes) y con otros tipos de trampa, para estudiar con mayor detalle las preferencias de alimentación hacia diferentes hospederos.
- Se recomienda completar este estudio con estudios de competencia vectorial para determinar si esta especie es el vector responsable de la transmisión de VON a gallinas centinela en el foco de transmisión, Puerto Barrios, Izabal.
- No se recomienda el uso de los resultados proporcionados por este estudio para el diseño de estrategias de control vectorial hasta que otros estudios hayan proporcionado información complementaria, necesaria para determinar el papel que la especie de zancudos *Cx. quinquefasciatus* juega en la dinámica de transmisión de enfermedades arbovirales como el VON.

## VI. LITERATURA CITADA

- Anderson, J.F. y A.J. Main. 2006. *Importance of vertical and horizontal transmission of West Nile virus by Culex pipiens in the northeastern United States*. Journal of Infectious Diseases 194:1577-1579
- , Main, A. J, Ferrandino, F. J., y T.G. Andreadis. 2007. *Nocturnal activity of mosquitoes (Diptera: Culicidae) in a West Nile virus focus in Connecticut*. Journal of Medical Entomology, 44(6): 1102-1108.
- Apperson, C.S., et al. 2004. *Host feeding patterns of established and potential mosquito vectors of West Nile virus in the eastern United States*. Vector-Borne Zoonotic Diseases 4:71-82.
- Arunachalam, N. et al. 2005. *Short Report: Observations on the multiple feeding behavior of Culex tritaeniorhynchus (Diptera: Culicidae), the vector of Japanese Encephalitis in Kerala in southern India*. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 77(2): 198-200.
- Austgen, L.E. et al. 2004. *Experimental infection of cats and dogs with West Nile virus*. Emerging Infectious Diseases, 10: 82-86.
- Bakonyi, T., Z. Hubálek, I. Rudolf, N. Nowotny. 2005. *Novel flavivirus or new lineage of West Nile virus, central Europe*. Emerging Infectious Diseases 11(2): 225-231
- Berthet, F.X., et al. 1997. *Extensive nucleotide changes and deletions within the envelope glycoprotein gene of Euro-African West Nile viruses*. Journal of General Virology 78:2293-2297.
- Biggerstaff, B. 2006. *PooledInfRate (Pooled Infection Rate)*. Version 3.0. Division of Vector-Born Infectious Diseases, National Center for Infectious Diseases, Centers for Disease Control and Prevention [Programa informático, complemento para Excel]. Disponible en Internet en: <http://www.cdc.gov/ncidod/dvbid/westnile/software.htm> [con acceso el 24 de abril de 2008].
- Black, W.C. IV y C.G. Moore. 1996. *Population biology as a tool for studying vector-borne diseases*. In: Beaty, B.J. y W.C. Marquardt (eds) *The Biology of Disease Vectors*, University press of Colorado. USA, págs. 393-416
- Boakye, D.A., J. Tang, P. Truc, A. Merriweather, y T.R. Unnasch. 1999. *Identification of bloodmeals in haematophagous Diptera by cytochrome B heteroduplex analysis*. Medical and Veterinary Entomology 13: 282-287

- Bondre, V.P., Jadi, R.S., Mishra, A.C.; Yergolkar, P.N.; y V. A. Arankalle. 2007. *West Nile virus isolates from India: evidence for a distinct genetic lineage*. Journal of General Virology 88: 875–884
- Boore, J.L. 1999. *Animal mitochondrial genomes*. Nucleic Acid Research 27(8): 1767-1780.
- Brandler, S., y F. Tangy. 2008. *Recombinant vector derived from live attenuated measles virus: Potential for flavivirus vaccines*. Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases 31: 271–291
- Brown, W.M., M. George, Jr. y A.C. Wilson. 1979. *Rapid evolution of animal mitochondrial DNA*. Proceedings of the National Academy of Science USA 76(4):1967-1971.
- Burke, D.S. y T.P. Monath. 2001. *Flaviviruses*. In: Knipe DM, Howley PM (eds) Field's Virology, 4th edn. Philadelphia: Lippincott Williams y Wilkins. 1043–1125
- Burkot, T.R.; W.G. Goodman y G.R. DeFoliart. 1981. *Identification of mosquito blood meals by enzyme-linked immunosorbent assay*. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 30(6): 1336-1341.
- Calisher, C. H., Karabatsos, N., Dalrymple, J. M., Shope, R. E., Porterfield, J. S., Westaway, E. G. y W.E. Brandt. 1989. *Antigenic relationships between Flaviviruses as determined by cross-neutralization tests with polyvalent antisera*. Journal of General Virology 70: 37-43.
- Campbell, G.L., Marfin, A.A., Lanciotti, R.S. y D.J. Gubler. 2002. *West Nile virus*. Lancet Infectious Diseases 2: 519-529
- CDC: Centers for Disease Control and Prevention. 1999. *Outbreak of West Nile-like viral encephalitis—New York, 1999*. MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report 48(38): 845-59
- : Centers for Disease Control and Prevention. 2007a. *West Nile virus update –United States, January 1–November 13 2007*. MMWR Morbidity and Mortality Weekly Report 56(45):1191-1192
- : Centers for Disease Control and Prevention 2007b. *Mosquito species producing WNV positives by year*. West Nile Virus, Division of Vector-Borne Infectious Diseases. Actualizado el 19/04/2007. Consultado el 18/01/2008. Disponible en <http://www.cdc.gov/ncidod/dvbid/westnile/mosquitoSpecies>
- Chambers, T.J., C. S. Hahn, R. Galler y C. M. Rice. 1990. *Flavivirus genome organization, expression, and replication*. Annual Review of Microbiology 44: 649-88
- Cicero, C. y N.K. Johnson. 2001. *Higher-level phylogeny of New World Vireos (Aves: Vireonidae) based on sequences of multiple mitochondrial DNA genes*. Molecular Phylogenetics and Evolution 20(1): 27–40

- Clark-Gil, S. y R.F. Darsie, Jr. 1983. *The mosquitoes of Guatemala: their identification, distribution and bionomics*. Mosquito Systematics 15(3): 151-284
- Cordón-Rosales, C. y M.E. Morales. 2008. *Reporte de resultados del proyecto "Vigilancia ecológica del virus del Oeste del Nilo -VON- en Izabal, Guatemala" Enero-Noviembre 2007*. Centro de Estudios en Salud (CES), CDC-CAP. Universidad del Valle de Guatemala. 7 pp.
- Daniel, W. W. 2002. *Bioestadística: Base para el análisis de las ciencias de la salud*. Cuarta edición. Limusa Wiley, México DF. 753 págs.
- Darsie, R.F. Jr. 1994. *A revised checklist of the mosquitoes of Guatemala including a new country record, Psorophora cyanescens*. Journal of the American Mosquito Control Association 10(4):511-514
- Dauphin, G., Zientara, S., Zeller, H. y M. Bernadette. 2004. *West Nile: worldwide current situation in animals and humans*. Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases 27: 343-355.
- Dupuis, A.P., II, et al. 2005 *Serologic evidence for West Nile virus transmission in Puerto Rico and Cuba*. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 73(2): 474-476
- Edman, J.D. y D.J. Taylor. 1968. *Culex nigripalpus: Seasonal shift in the bird-mammal feeding ratio in a mosquito vector of human encephalitis*. Science 161:67-68.
- Elizondo-Quiroga, A., et al. (2006) *Host-feeding preference of Culex quinquefasciatus in Monterrey, northeastern Mexico*. Journal of the American Mosquito Control Association 22(4): 654-661
- Flint, S.J., Enquist, L.W., Racaniello, V.R. y A.M. Skalka. 2004. *Principles of virology: Molecular biology, pathogenesis, and control of animal viruses*. 2<sup>nd</sup> edn. ASM Press. 918 pp.
- Goddard, J. 2003. *Physician's guide to arthropods of medical importance*. 4<sup>th</sup> ed. CRC Press. USA, 444 págs.
- Gomes, A.C., N.N. Silva, A.M. Marques y M. Brito. 2003. *Host-feeding patterns of potential human disease vectors in the Paraíba Valley Region, State of Sao Paulo, Brazil*. Journal of Vector Ecology 28(1):74-78.
- Gorrochotegui-Escalante, N., M. De Lourdes Munoz, I. Fernandez-Salas. 2000. *Genetic isolation by distance among Aedes aegypti populations along the northeastern coast of Mexico*. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 62: 200-209.
- Granwehr, B.P., et al. 2004. *West Nile virus: where are we now?* Lancet Infectious Diseases 4: 547-556

- Griffiths A.J., *et al.* 2002. *Genética*. 7ª ed. McGraw-Hill Interamericana. Madrid, 880 pp.
- Gubler, D.J. 2002. *The global emergence/resurgence of arboviral diseases as public health problem*. Archives of Medical Research 33:330–342
- , Kuno, G. y L. Markoff. 2007. *Flaviviruses*. In: Knipe DM, Howley PM (eds) *Field's Virology*, 5th ed. Philadelphia: Lippincott Williams y Wilkins. 1153-1252
- Hartemink, N.A., *et al.* *Importance of Bird-to-Bird Transmission for the Establishment of West Nile Virus*. Vector-Borne Zoonotic Diseases 7(4): 575-584.
- Hassan, K.H., E.W. Cupp, G.E. Hill, C.R. Katholi, K. Klingler, y T.R. Unnasch. 2003. *Avian host preference by vectors of Eastern Equine Encephalomyelitis virus*. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 69(6):641-647.
- Hayes, E.B., *et al.* 2005a. *Epidemiology and transmission dynamics of West Nile virus disease*. Emerging Infectious Diseases 11(8): 1167-1173
- , *et al.* 2005b. *Virology, pathology and clinical manifestation of West Nile virus disease*. Emerging Infectious Diseases 11(8): 1174-1179
- Hebert, P. D. N., *et al.* 2003a. *Biological identifications through DNA barcodes*. Proceedings of the Royal Society of London B 270:313–322.
- , S. Ratnasingham, y J.R. deWaard. 2003b. *Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species*. Proceedings of the Royal Society of London B (supl.): 4 págs.
- Hess, A.D., R.O. Hayes y C.H. Tempelis. 1968. *The use of the forage ratio technique in mosquito host preference studies*. Mosquito News 28(3): 386-389.
- y R.O. Hayes. 1970. *Relative potential of domestic animals for zooprophyllaxis against mosquito vectors of encephalitis*. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 19(2): 327-334.
- Holmes, E.C. 1998. *Molecular epidemiology and evolution of emerging infectious diseases*. British Medical Bulletin 54(3): 533-543
- Hoshino, K., *et al.* 2006. *Genetic characterization of a new insect Flavivirus isolated from Culex pipiens mosquito in Japan*. Virology 359:405–414
- Hubálek, Z. y J. Halouzka. 1999. *West Nile Fever—a reemerging mosquito-borne viral disease in Europe*. Emerging Infectious Diseases 5(5): 643-650
- INE: Instituto Nacional de Estadística. 2002. *Censo nacional de población*. [En línea] en: <<http://www.ine.gov.gt/censos.html>> [con acceso el 17 de marzo de 2008]

- INSIVUMEH: Instituto Nacional de Sismología, Vulcanología, Meteorología e Hidrología, [sin fecha]. *Parámetros meteorológicos: Estación Puerto Barrios*. [En línea] en: <insivumeh@insivumeh.gob.gt> [con acceso el 15 de marzo de 2008]
- Irby W.S. y C.S. Apperson. 1988. *Hosts of mosquitoes in the coastal plain of North Carolina*. *Journal of Medical Entomology* 25: 85-93
- Irwin, D.M.; T.D. Kocher, y A.C. Wilson. 1991. *Evolution of the cytochrome b gene of mammals*. *Journal of Molecular Evolution* 32: 128-144.
- Johns, G.C. y J.C. Avise. 1998. *A comparative summary of genetic distances in the vertebrates from the mitochondrial cytochrome b gene*. *Molecular Biology and Evolution* 15: 1481-1490
- Jorge B.M. y G.A. Bevier. 1958. *Yellow fever in the lower Motagua Valley, Guatemala*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 7(1): 25-35.
- Karabastros, N. 1985. *Jutiapa*. En: *International Catalogue of Arboviruses*. 3ª ed. American Society of Tropical Medicine and Hygiene. Texas. Pp. 529
- Kay, B.H., P.F.L. Boreham y J.D. Edman. 1979. *Application of the "feeding index" concept to studies of mosquito host-feeding patterns*. *Mosquito News* 39: 68-72
- Kent, R.J. y D.E. Norris. 2005. *Identification of mammalian blood meals in mosquitoes by a multiplexed polymerase chain reaction targeting cytochrome b*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 73(2):336-342.
- , P.E. Thuma, S. Mharakurwa, y D.E. Norris. 2007. *Seasonality, blood feeding behavior, and transmission of Plasmodium falciparum by Anopheles arabiensis after an extended drought in southern Zambia*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 76(2): 267-274.
- , 2008. *Host preference of potential West Nile virus vectors in Guatemala*. 2007 Robert E. Shope Fellowship in Infectious Diseases. Final Report. 20 pp.
- Kilpatrick, A.M., et al. 2005. *West Nile virus risk assessment and the bridge vector paradigm*. *Emerging Infectious Diseases* 11(3): 425-429.
- et al. 2006a. *Host heterogeneity dominates West Nile virus transmission*. *Proceedings of the Royal Society*, B.7 pp.
- , et al. 2006b. *West Nile virus epidemics in North America are driven by shifts in mosquito feeding behavior*. *PLOS Biology*. 4(4):0606-0610
- , et al. 2007. *Genetic influences on mosquito feeding behavior and the emergence of zoonotic pathogens*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 77(4):667-671.

- Klowden, M.J. 1996. *Vector behavior*. In: Beaty, B.J. y W.C. Marquardt (eds) *The Biology of Disease Vectors*, University press of Colorado. USA, págs. 34-50.
- Kocher, T.D., et al. 1989. *Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: Amplification and sequencing with conserved primers*. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 86:6196-6200.
- 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
- , 2003. *West Nile Virus: epidemiology and ecology in North America*. *Advances in Virus Research*, 61: 185-234.
- Kramer, L.D., L.M. Styer y G.D. Ebel. 2008. *A global perspective on the epidemiology of West Nile virus*. *Annual Review of Entomology* 53:61-81
- Kuno, G. y G.J.J. Chang. 2005. *Biological transmission of arboviruses: Reexamination of and new insights into components, mechanisms, and unique traits as well as their evolutionary trends*. *Clinical Microbiology Reviews* 18(4):608-637
- , Chang, G.J.J, Tsuchiya, K.R. Karabatsos, N. y C.B. Cropp. 1998. *Phylogeny of the genus Flavivirus*. *Journal of Virology* 72(1): 73-83
- Lanciotti, R.S. 2003. *Molecular amplification assays for the detection of flaviviruses*. *Advances in Virus Research* 61: 67-99
- , et al. 2002. *Complete genome sequences and phylogenetic analysis of West Nile virus strains isolated from the United States, Europe, and the Middle East*. *Virology* 298: 96-105
- , et al. 1999. *Origin of the West Nile virus responsible for an outbreak of encephalitis in the northeastern United States*. *Science* 286: 2333 - 2337
- , 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* 38:4066-4071.
- Lang, B.F., M.W. Gray y G. Burger. 1999. *Mitochondrial genome evolution*. *Annual Review of Genetics* 33:351-397.
- Lee, J.H. et al. 2002. *Identification of mosquito avian-derived blood meals by polymerase chain reaction-heteroduplex analysis*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 66 (5):599-604.
- Lewin, B. 2008. *Genes IX*. Jones and Bartlett. 9<sup>na</sup> ed. Miami. 892 pp.
- Lindenbach, B.D. y C.M. Rice. 2001. *Flaviviridae: The viruses and their replication*. In: Knipe DM, Howley PM (eds) *Field's Virology*, 4th ed. Philadelphia: Lippincott Williams y Wilkins. 991-1041

- ; H.J. Thiel, y C.M. Rice. 2007. *Flaviviridae: The viruses and their replication*. In: Knipe DM, Howley PM (eds) *Field's Virology*, 5th ed. Philadelphia: Lippincott Williams y Wilkins. 1101-1152
- Mackenzie, J.S., D.J. Gubler y L.R. Petersen. 2004. *Emerging flaviviruses: the spread and resurgence of Japanese encephalitis, West Nile and dengue viruses*. *Nature Medicine* 10(12): S98-S109
- Marquardt, W.C., R.S. Demaree y R.B. Grieve. 1999. *Parasitology and vector biology*. 2a ed. Academic Press. California. 702 pp.
- McGee, C. E., B.S. Schneider, Y.A. Girard, D.L. Vanlandingham, y S. Higgs. 2007. *Nonviremic transmission of West Nile virus: evaluation of the effects of space, time, and mosquito species*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 76(3): 424-430.
- Mckinney, R.M., J.T. Spillane y P. Holden. 1972. *Mosquito blood meals: Identification by a fluorescent antibody method*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 21: 999-1003.
- McMinn, P. 1997. *The molecular basis of virulence of the encephalitogenic flaviviruses*. *Journal of General Virology* 78: 2711-2722
- Meece, J. K., et al. 2005. *Identification of mosquito bloodmeal source by terminal restriction fragment length polymorphism profile analysis of the cytochrome b gene*. *Journal of Medical Entomology* 42: 657-667.
- Molaei, G., et al. 2006. *Molecular identification of blood-meal sources in Culiseta melanura and Culiseta morsitans from an endemic focus of Eastern Equine Encephalitis virus in New York*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 75(6):1140-1147.
- , et al. 2007. *Host feeding pattern of Culex quinquefasciatus (Diptera: Culicidae) and its role in transmission of West Nile virus in Harris County, Texas*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 77(1): 73-81.
- Monzón, M. L. 2007. *Estudio de la densidad relativa de Culex quinquefasciatus y detección de Flavivirus en zancudos de esta especie capturados en el municipio de Puerto Barrios, Izabal, Guatemala*. Tesis de Licenciatura en Bioquímica y Microbiología, Universidad del Valle de Guatemala. Guatemala, 124 pp.
- Morales-Betoulle, M.E., et al. 2006. *West Nile virus in horses, Guatemala*. *Emerging Infectious Diseases* 12(6): 1038-1039.
- , M.E., et al. 2007. *La presencia de aves migratorias podría reducir la transmisión de Virus del Oeste del Nilo en Guatemala*. *Revista de la Universidad del Valle de Guatemala* 16:99-110.

- , M. E., *et al.* 2008. *A new mosquito flavivirus from Izabal, Guatemala*. *Journal of Medical Entomology* 45(6): 1187-1190.
- Mores, C.N., *et al.* 2007. *Experimental transmission of West Nile virus by Culex nigripalpus from Honduras*. *Vector Borne and Zoonotic Diseases* 7(2): 279-284.
- Mota, J., *et al.* 2002. *Identification of blood meal source and infection with Trypanosoma cruzi of Chagas disease vectors using a multiplex cytochrome b polymerase chain reaction assay*. *Vector Borne and Zoonotic Diseases* 7(4):617-627.
- Mukabana, W.R., W. Takken, y B.G.J. Knols. 2002. *Analysis of arthropod bloodmeals using molecular genetic markers*. *Trends in Parasitology* 18(11):505-509
- Nasci, R.S. y B.R. Miller. 1996. *Culicine mosquitoes and the agents they transmit*. In: Beaty, B.J. y W.C. Marquardt (eds) *The Biology of Disease Vectors*, University press of Colorado. USA, págs. 34-50.
- Nash, D., *et al.* 2001. *The Outbreak of West Nile Virus Infection in the New York City Area in 1999*. *New England Journal of Medicine* 344: 1807-1814
- Ngo, K.A. y L.D. Kramer. 2003. *Identification of mosquito bloodmeals using polymerase chain reaction (PCR) with order-specific primers*. *Journal of Medical Entomology* 40(2): 215-222.
- Niebylski, M.L. y C.L. Meek. 1992. *Blood-feeding of Culex mosquitoes in an urban environment*. *Journal of the American Mosquito Control Association* 8(2): 173-177.
- Nielsen, C.F., Armijos, M.V., Wheeler, S. *et al.* 2008. *Risk factors associated with human infection during the 2006 West Nile virus outbreak in Davis, a residential community in Northern California*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 78(1): 53-62.
- OPS: Organización Panamericana de la Salud. 2008. *Number of reported cases of Dengue y Dengue hemorrhagic fever (DHF), region of the Americas*. Actualizado el 5 de marzo de 2008. Consultado el 24 de marzo de 2008. Disponible en <http://www.ops-oms.org/english/ad/dpc/cd/dengue.htm>
- Parida, S.K. *et al.* 2006. *Host feeding patterns of Malaria vectors of Orissa, India*. *Journal of the American Mosquito Control Association* 22(4):629-634.
- Parson, W., Pegoraro, K., Niederstätter, H., Föger, M. y M. Steinlechner. 2000. *Species identification by means of the cytochrome b gene*. *International Journal of Legal Medicine* 114:23-28
- Patrican, L.A. *et al.* 2007. *Host feeding patterns of Culex mosquitoes in relation to trap habitat*. *Emerging Infectious Diseases* 13(12):1921-1923.

- Petersen, L.R. y J.T. Roehrig. 2001. *West Nile Virus: A reemerging global pathogen*. Emerging Infectious Diseases 7(4): 611-614
- Rappole, J.H.; S.R. Derrickson, y Z. Hubálek 2000. *Migratory birds and spread of West Nile virus in the Western hemisphere*. Emerging Infectious Diseases 6(4): 319- 328.
- Rappole, J.H. y Z. Hubálek. 2003. *Migratory birds and West Nile virus*. Journal of Applied Microbiology 94: 47S–58S.
- Ratnasingham, S. y P.D.N. Hebert. 2007. *BOLD: The barcode of life data system (www.barcodinglife.org)*. Molecular Ecology Notes., Journal compilation Blackwell Publishing, 10 págs.
- Reiter, P. 1983. *A portable, battery-powered trap for collecting gravid Culex mosquitoes*. Mosquito News. 43: 496-498.
- Rutledge, C. R. *et al.* 2003. *West Nile virus infection rates in Florida Culex (Diptera: Culicidae) mosquitoes do not accurately reflect transmission rates in nature*. Journal of Medical Entomology 40(3): 253-258.
- Samuel, M.A. y M.S. Diamond. 2006. *Pathogenesis of West Nile virus infection: a balance between virulence, innate and adaptive immunity and viral evasion*. Journal of Virology 80(19): 9349-9356.
- Sardelis, M.R. *et al.* 2001. *Vector competence of selected North American Culex and Coquillettidia mosquitoes for West Nile Virus*. Emerging Infectious Diseases 7(6):1018-1022
- Saul, A. 2003. *Zooprophylaxis or zoopotentialization: the outcome of introducing animals on vector transmission is highly dependent on the mosquito mortality while searching*. Malaria Journal 2(32): 18 pp.
- Savage, H.M., *et al.* 2007. *Host choice and West Nile Virus infection rates in blood-fed mosquitoes, including members of the Culex pipiens complex, from Memphis and Shelby County, Tennessee 2002–2003*. Vector Borne and Zoonotic Diseases 7(3): 365-386.
- Simon, C., F. *et al.* 1994. *Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers*. Annals of the Entomological Society of America 87 (6):651-701.
- Smith, D. L., J. Dushoff y F.E. McKenzie. 2004. *The risk of a mosquito-borne infection in a heterogeneous environment*. PLOS Biology 2(11): 1957-1964.
- Sudia, W. D. y R. W. Chamberlain. 1962. *Battery operated light trap, an improved model*. Mosquito News 22: 126-129.

- Swaddle, J. P. y S. E. Calos. 2008. *Increased avian diversity is associated with lower incidence of human West Nile infection: observation of the dilution effect*. PLoS ONE 3(6): e2488. 8 págs.
- Tempelis, C.H. 1975. *Host-feeding patterns of mosquitoes, with a review of advances in analysis of blood meals by serology*. Journal of Medical Entomology 11(6):635-653.
- y M.F. Lofy. 1963. *A modified precipitin method for identification of mosquito blood meals*. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 12:825-831.
- y M.L. Rodrick. 1972. *Passive hemagglutination inhibition technique for the identification of arthropod blood meals*. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 21: 238-245
- et al. 1970. *Blood-feeding habits of four species of mosquito found in Hawaii*. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 19(2):335-341.
- Washino, R.K. y C.H. Tempelis. 1983. *Mosquito host bloodmeal identification: methodology and data analysis*. Annual Review of Entomology 28:179-201.
- Woodring, J.L., S. Higgs y B.J. Beaty. 1996. *Natural cycles of vector-borne pathogens*. In: Beaty, B.J. y W.C. Marquardt (eds) *The Biology of Disease Vectors*, University press of Colorado. USA, págs. 51-72.
- Zinser et al. 2004. *Culex quinquefasciatus (Diptera: Culicidae) as a potential West Nile virus vector in Tucson, Arizona: blood meal analysis indicates feeding on both humans and birds*. Journal of insect science, 4(20):3pp.

## **VII. APÉNDICE**

APENDICE I. Procedimientos Operacionales Estándar (POE) para Análisis de Ingesta Sanguínea





**Laboratorio de  
Enfermedades Arbovirales  
y Zoonóticas  
CES-UVG/CDC-CAP**

<b>POE #:</b>	WNV-IS001
<b>Revisión #:</b>	1
<b>Página:</b>	1 de 4
<b>Fecha de implementación:</b>	12/06/2008
<b>Revisado/Actualizado:</b>	19/09/2009

<b>Título:</b>	Disección de zancudos alimentados	<b>Aprobado por:</b>	ME Morales-Betoulle, Investigador Principal
<b>Elaborado por:</b>	AS González-Reiche		

<b>1. Propósito:</b>	Establecer el procedimiento para realizar la disección de zancudos alimentados (separación de abdomen de cabeza, tórax y patas).		
<b>2. Aplicación:</b>	La ingesta sanguínea en abdómenes se utiliza para la identificación del hospedero vertebrado del zancudo. El resto del cuerpo (cabeza, tórax y patas) es utilizado para la detección de flavivirus y Virus del Oeste del Nilo por técnicas moleculares.		
<b>3. Documentos asociados:</b>			
3.1	<b>Otros POE :</b>		
	POE-WNV-IS002 Extracción de ADN DNAzol.		
	POE-WNV-IS003 Extracción de ADN Kit.		
	Protocolo para macerado de zancudos.		
3.2	Base de datos electrónica en formato Access para registro de datos de colecta de campo y procesamiento en laboratorio (K:\WNV\ArboEpiMosquitos.mdb).		
3.3	Savage, H.M. <i>et al.</i> 2007. Vector Borne and Zoonotic Diseases 7(3): 365-386.		
3.4	Molaei, G. <i>et al.</i> 2006. Emerging Infectious Diseases 12(3): 468-474		
<b>4. Principio</b>	Obtención de abdómenes intactos de zancudos alimentados con sangre fresca para extracción de ADN e identificación por técnicas moleculares del hospedero vertebrado. Obtención de "pools" de cabezas, tórax y patas para extracción de ARN la detección de flavivirus y Virus del Oeste del Nilo por PCR.		
	Los abdómenes se colocan en tubos individuales y el resto del cuerpo se reúne en "pools" en seco, en tubos de 1.5 mL para su posterior análisis. Todas las muestras se almacenan a -70° C.		
<b>5. Seguridad:</b>			
5.1	Trabajar en cabina de bioseguridad nivel 2+, Laboratorio I12-302.		

 <p style="text-align: center;"><b>Laboratorio de Enfermedades Arbovirales y Zoonóticas CES-UVG/CDC-CAP</b></p>		<b>POE #:</b>	WNV-IS001
		<b>Revisión #:</b>	1
		<b>Página:</b>	2 de 4
		<b>Fecha de implementación:</b>	12/06/2008
		<b>Revisado/Actualizado:</b>	19/09/2009
<b>Título:</b>	Disección de zancudos alimentados	<b>Aprobado por:</b>	ME Morales-Betoulle, Investigador Principal
<b>Elaborado por:</b>	AS González-Reiche		
	5.2	Hacer uso de bata protectora, guantes y mascarilla desechables durante todo el procedimiento.	
<b>6.</b>	<b>Equipos, materiales y reactivos:</b>		
	6.1	Portaobjetos	
	6.2	Pinzas	
	6.3	Pines para disección	
	6.4	Microtubos (eppendorf) 1.8 mL, estériles.	
	6.5	Microtubos (eppendorf) 1.5 mL, estériles de doble seguro.	
	6.6	Gradillas	
	6.7	Etanol 70%	
	6.8	Beaker con detergente (extrán alcalino 5%)	
	6.9	Piseta con agua destilada	
	6.10	Beaker con Cloro al 10% para descarte de portaobjetos	
	6.11	Hielo	
	6.12	Pools de zancudos alimentados	
		Kimwipes, marcador permanente punta fina, bata, guantes, etc.	
<b>7.</b>	<b>Procedimiento:</b>		
	<b>Preparación de material</b>		
	7.1	Desinfectar todos los materiales con etanol al 70%. Desinfectar la cabina y exponer los materiales a luz UV 15 min antes de comenzar.	
	7.2	Obtener las muestras a procesar del congelador (I11-114) y colocarlas en una gradilla. <u>Mantener todas las muestras en hielo durante todo el procedimiento.</u> (Nota: si se trabaja con especímenes secos no es necesario utilizar hielo)	
	<b>Procesamiento de muestras</b>		
	7.3	Con la pinza sacar un zancudo del pool. Colocarlo sobre un portaobjeto limpio. Regresar el pool al hielo.	

 <p style="text-align: center;"><b>Laboratorio de Enfermedades Arbovirales y Zoonóticas CES-UVG/CDC-CAP</b></p>		<b>POE #:</b>	WNV-IS001
		<b>Revisión #:</b>	1
		<b>Página:</b>	3 de 4
		<b>Fecha de implementación:</b>	12/06/2008
		<b>Revisado/Actualizado:</b>	19/09/2009
<b>Título:</b>	Disección de zancudos alimentados	<b>Aprobado por:</b>	ME Morales-Betoulle, Investigador Principal
<b>Elaborado por:</b>	AS González-Reiche		
	7.4	Con ayuda de un pin de disección sujetar el zancudo por el tórax sobre el portaobjetos. Hacer presión con la pinza entre el abdomen y el tórax y separar el abdomen con cuidado de no derramar la sangre contenida.	
	7.5	Colocarlo en un microtubo estéril de doble seguro (1.5 mL) y rotulado con el número de pool y el número de individuo. Ej. Si el número de pool es GU-2007-09010, el número de individuo será 9010-01 si es el primer zancudo y así sucesivamente con el resto de zancudos del pool. Al iniciar con un nuevo pool la numeración comienza nuevamente de 01. Utilizar un tubo por abdomen.	
	7.6	Colocar el resto del cuerpo del zancudo (cabeza, tórax y patas) en un microtubo estéril de 1.8 mL rotulado con el número de pool. En este mismo tubo se colocaran las cabezas, tórax y patas del resto de zancudos que sean procesados del pool correspondiente.	
	7.7	Utilizar un pin de disección por individuo procesado. Descartar los pines utilizados en extrán al 5%. Entre cada individuo, se enjuagan las pinzas con el detergente y agua. Luego se limpian con EtOH 70% y se secan con kimwipe limpio.	
	7.8	Utilizar un portaobjetos por zancudo o por cada 2 zancudos en cada uno de los extremos del portaobjetos para evitar contaminación cruzada. Colocar los portaobjetos usados en cloro al 10%.	
	7.10	Repetir este procedimiento con el resto de zancudos del pool y con el resto de pools a trabajar. Se recomienda trabajar por tandas de 10 zancudos. (Nota: Con especímenes secos se puede procesar un mayor número).	
<b>Almacenamiento y transporte de muestras</b>			
	7.11	Trasladar las muestras en hielo y preservar en el congelador a -70° C hasta ser procesadas (Ver Sección 6: Documentos asociados).	
<b>Limpieza y desinfección del área de trabajo</b>			
	7.12	Descartar los tubos utilizados en el recipiente de descarte con bolsa roja para desechos biopeligrosos. Cerrar la bolsa y colocarla en la bolsa grande de desechos que se encuentra fuera de la cabina.	
	7.13	Colocar las pinzas y pines en el recipiente con cloro al 10%.	



**Laboratorio de  
Enfermedades Arbovirales  
y Zoonóticas  
CES-UVG/CDC-CAP**

**POE #:** WNV-IS001

**Revisión #:** 1

**Página:** 4 de 4

**Fecha de  
implementación:** 12/06/2008

**Revisado/Actualizado:** 19/09/2009

**Título:**

Disección de zancudos  
alimentados

**Aprobado por:**

ME Morales-  
Betoulle,  
Investigador  
Principal

**Elaborado  
por:**

AS González-Reiche

	7.14	Limpiar la cabina y los materiales restantes no desechables con etanol al 70% y exponer a luz UV por 15 minutos.
	7.15	Esterilizar en autoclave todas las herramientas no desechables por 25 minutos dentro de bolsas de autoclave o papel Kraft.
<b>8</b>	<b>Responsables</b>	
	<b>Personal</b> – Investigadores y estudiantes que realicen el procedimiento. Verificar que todo el material para realizar este POE esté completo. Esterilizar periódicamente tubos de 1.5 mL exclusivos para PCR en suficiente cantidad para realizar el procedimiento.	
<b>9</b>	<b>Manejo de registros</b>	
	<b>Anotar en el cuaderno de laboratorio</b> el número e identificación de cada muestra procesada, anotar en dónde se almacenó y a qué temperatura. Rotular adecuadamente las cajas en las que se almacenaron las muestras, con fecha, tipo de muestras que contienen (especie de zancudo, lugar de colecta, año, etc.).	




**Laboratorio de  
Enfermedades Arbovirales  
y Zoonóticas  
CES-UVG/CDC-CAP**

<b>POE #:</b>	WNV-IS003
<b>Revisión #:</b>	1
<b>Página:</b>	1 de 4
<b>Fecha de implementación:</b>	13/06/2008
<b>Revisado/Actualizado:</b>	19/09/2009

<b>Título:</b>	Extracción de ADN de ingesta sanguínea con DNAzol	<b>Aprobado por:</b>	ME Morales-Betoulle, Investigador Principal
<b>Elaborado por:</b>	AS González-Reiche		

<b>1</b>	<b>Propósito:</b>
	Extraer ADN de la sangre contenida en el abdomen de zancudos alimentados.
<b>2</b>	<b>Aplicación:</b>
	Análisis de ingesta sanguínea en abdómenes para identificación de hospedero vertebrado.
<b>3</b>	<b>Principio:</b>
	Obtención de ADN por un método de extracción orgánica para el análisis posterior por técnicas moleculares, para identificación de hospedero vertebrado. El reactivo de DNAzol es una solución de lisis de detergentes suaves y guanidina que permite la precipitación selectiva de ADN de lisado de células.
<b>4</b>	<b>Documentos asociados:</b>
	<b>Otros POE:</b>
4.1	WNV-IS001 Disección de zancudos WNV-IS004 PCR ND4 control de calidad
4.2	Harrington & Norris. 2004. DNAzol extraction protocol. JHSPH. 1 pp.
4.3	Life Technologies. 2000. DNAzol® Reagent. GIBCO. Inserto, disponible en <a href="http://www.invitrogen.com">www.invitrogen.com</a>
4.4	MSDS 10503027. DNAzol® Reagent. Disponible en <a href="http://www.invitrogen.com">www.invitrogen.com</a>
<b>5</b>	<b>Seguridad</b>
5.1	El reactivo de DNAzol es tóxico al contacto con la piel, ojos y por inhalación o ingestión. El contacto con ácidos y cloro libera gases tóxicos.
5.2	Hacer uso de bata protectora y guantes de nitrilo desechables durante todo el procedimiento.

	<b>Laboratorio de Enfermedades Arbovirales y Zoonóticas CES-UVG/CDC-CAP</b>	<b>POE #:</b>	WNV-IS003
		<b>Revisión #:</b>	1
		<b>Página:</b>	2 de 4
		<b>Fecha de implementación:</b>	13/06/2008
		<b>Revisado/Actualizado:</b>	19/09/2009
<b>Título:</b>	Extracción de ADN de ingesta sanguínea con DNAzol	<b>Aprobado por:</b>	ME Morales- Betoulle, Investigador Principal
<b>Elaborado por:</b>	AS González-Reiche		


<b>6</b>	<b>Equipos, materiales y reactivos:</b>	
	6.1	Pistilos de polipropileno
	6.2	Motor para pistilos con baterías
	6.3	Microcentrífuga
	6.4	Gradillas
	6.5	Microtubos de 1.5 mL estériles de doble seguro
	6.6	Botella con NaOH 1.0 M para descarte de pistilos
	6.7	DNAzol (Invitrogen, Inc., 10503-027)
	6.8	Etanol 96-100% grado reactivo
	6.9	Etanol 75% en H <sub>2</sub> O
	6.10	Buffer TE ½X (SIGMA) o Buffer AE (QIAGEN)
	6.11	Bolsa roja para descarte de desechos biopeligrosos
	6.12	Etanol al 70% para limpieza y desinfección
	6.13	Guantes, toallas de papel, marcador permanente de punta fina, etc.
		<b>Para especímenes secos</b>
	6.14	Buffer de rehidratación SCC 2X + SDS 1%
	6.15	Buffer TE 1X
<b>7</b>	<b>Procedimientos:</b>	
	Desinfectar el área de trabajo con etanol al 70%. Trabajar en la cabina de bioseguridad los pasos de lisis (7.1-7.4).	
	<b>Para especímenes secos:</b>	

 <p style="text-align: center;"><b>Laboratorio de Enfermedades Arbovirales y Zoonóticas CES-UVG/CDC-CAP</b></p>	<b>POE #:</b>	WNV-IS003
	<b>Revisión #:</b>	1
	<b>Página:</b>	3 de 4
	<b>Fecha de implementación:</b>	13/06/2008
	<b>Revisado/Actualizado:</b>	19/09/2009
<b>Título:</b>	Extracción de ADN de ingesta sanguínea con DNAzol	<b>Aprobado por:</b> ME Morales-Betoulle, Investigador Principal
<b>Elaborado por:</b>	AS González-Reiche	

7.1	En la cabina de bioseguridad, agregar a los abdómenes 100 µL de buffer de rehidratación, incubar por 20 minutos a temperatura ambiente.
7.2	Quitar el buffer con pipeta y agregar 100 µL de TE 1X, agitar suavemente para lavar el abdomen y centrifugar 10 minutos a 15°C a 2000 rpm.
7.3	Remover el TE con pipeta. Si hubiera un poco de sangre en el fondo del tubo, sacar el buffer extrayendo la menor cantidad de ésta posible.
<b>Procesamiento de muestras:</b>	
7.4	Homogenizar cada abdomen con un pistilo azul en 100 µL de DNAzol hasta que no queden partes reconocibles.
7.5	Centrifugar por 10 min a 10,000 g (10,400 rpm) a 15° C.
7.6	Transferir el sobrenadante a un nuevo tubo de microcentrifuga de doble seguro rotulado con el número de muestra, y la fecha. <i>El pellet se puede guardar a -70° C (opcional).</i>
7.7	Agregar a cada tubo 50 µL de EtOH 96-100%. Mezclar por inversión 5-8 veces e incubar a temperatura ambiente por 3 min.
7.8	Centrifugar en microcentrifuga a 5,000g (7,300 rpm) por 5 min a 15° C. Remover el sobrenadante.
7.9	Lavar el pellet de ADN con 1.0 mL de EtOH 75%, mezclar por inversión 3-6 veces para resuspender el pellet. Centrifugar en microcentrifuga a 5,000g (7,300 rpm) por 5 min a 15° C. Remover el sobrenadante.
7.10	Repetir paso 7.9
7.11	Remover el EtOH restante y secar el pellet al aire (10-15 min).

 <p style="text-align: center;"><b>Laboratorio de Enfermedades Arbovirales y Zoonóticas CES-UVG/CDC-CAP</b></p>	<b>POE #:</b>	WNV-IS003
	<b>Revisión #:</b>	1
	<b>Página:</b>	4 de 4
	<b>Fecha de implementación:</b>	13/06/2008
	<b>Revisado/Actualizado:</b>	19/09/2009
<b>Título:</b>	Extracción de ADN de ingesta sanguínea con DNAzol	<b>Aprobado por:</b> ME Morales-Betoulle, Investigador Principal
<b>Elaborado por:</b>	AS González-Reiche	

7.12	Resuspender el pellet en 100 µL de H <sub>2</sub> Odd, ½TE o buffer AE. Almacenar por una noche a 4° C para maximizar la rehidratación del pellet.
7.13	Para uso diario almacenar a -20° C y para largo plazo a -80° C.
<b>Limpieza del área de trabajo</b>	
7.14	Al terminar, desinfectar el área de trabajo con etanol al 70%. Descartar puntas y tubos en la bolsa de desechos biopeligroso.
7.15	Los pissetos se descartan en una solución de NaOH 1.0 M. Se lavan con bastante agua, luego extrán al 5%. Se enjuagan con agua destilada y se esterilizan por autoclave antes de volverlos a utilizar.
<b>8</b>	<b>Responsables:</b>
	<b>Personal</b> – Investigadores y estudiantes que realicen el procedimiento. Verificar que todo el material para realizar este POE esté completo. Esterilizar periódicamente tubos de 1.5 mL exclusivos para PCR en suficiente cantidad para realizar el procedimiento.
<b>9</b>	<b>Manejo de registros:</b>
	<b>Anotar en el cuaderno de laboratorio</b> el número e identificación de cada muestra procesada, anotar en dónde se almacenó y a qué temperatura. Rotular adecuadamente las cajas en las que se almacenaron las muestras, con fecha, tipo de muestras que contienen (especie de zancudo, lugar de colecta, año, etc.).

	<b>Laboratorio de Enfermedades Arbovirales y Zoonóticas CES-UVG/CDC-CAP</b>	<b>POE #:</b>	WNV-IS003
		<b>Revisión #:</b>	1
		<b>Página:</b>	1 de 1
		<b>Fecha de implementación:</b>	13/06/2008
		<b>Revisado/Actualizado:</b>	19/09/2009
<b>Título:</b>	Extracción de ADN de ingesta sanguínea con Kit Qiagen	<b>Aprobado por:</b>	ME Morales-Betoulle, Investigador Principal
<b>Elaborado por:</b>	AS González-Reiche, CM Paiz-Reyes		

<b>1</b>	<b>Propósito:</b>
	Extraer ADN de la sangre contenida en el abdomen de zancudos alimentados.
<b>2</b>	<b>Aplicación:</b>
	Análisis de ingesta sanguínea en abdómenes para identificación de hospedero vertebrado.
<b>3</b>	<b>Principio:</b>
	Obtención de ADN por un método de extracción rápida con Proteasa o Proteinasa K, para el análisis posterior por técnicas moleculares. Este ADN es utilizado para la identificación de hospedero vertebrado.
<b>4</b>	<b>Referencias:</b>
	<b>Revisar antes de realizar este procedimiento</b>
	<b>Otros POEs:</b> <b>WNV-IS001</b> - Disección de zancudos alimentados <b>WNV-IS002</b> – Extracción de ADN con DNAzol <b>WNV-IS004</b> – PCR ND4 control de calidad
	<b>Documentos suplementarios:</b> 4.2 QIAGEN. 2003. QIAamp DNA mini kit and QIAamp DNA blood mini kit handbook. Disponible en <a href="http://www.qiagen.com">www.qiagen.com</a>
<b>5</b>	<b>Seguridad</b>
	5.1 Hacer uso de bata protectora y guantes de nitrilo desechables durante todo el procedimiento.
<b>6</b>	<b>Equipos, materiales y reactivos:</b>
	6.1 Pistilos azules limpios y estériles
	6.2 Motor para pistilos con baterías



**Laboratorio de  
Enfermedades Arbovirales  
y Zoonóticas  
CES-UVG/CDC-CAP**

**POE #:** WNV-IS003

**Revisión #:** 1

**Página:** 2 de 2

**Fecha de  
implementación:** 13/06/2008

**Revisado/Actualizado:** 19/09/2009

**Título:** Extracción de ADN de ingesta  
sanguínea con Kit Qiagen

**Aprobado por:** ME Morales-  
Betoulle,  
Investigador  
Principal

**Elaborado  
por:** AS González-Reiche, CM Paiz-  
Reyes

6.3	Microcentrífuga
6.4	Gradillas
6.5	Microtubos de 1.5 mL estériles de doble seguro
6.6	Beaker con NaOH 1.0 M para descarte de pistilos
6.7	Etanol 100% grado reactivo
6.8	QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen)
6.9	PBS (SIGMA)
6.10	Recipiente o bolsa para de descarte de desechos biopeligrosos
6.11	Etanol al 70% para limpieza y desinfección
6.12	Guantes, kimwipes, marcador permanente de punta fina, etc.
	<b>Para especímenes secos</b>
6.13	Buffer de rehidratación SCC 2X + SDS 1%
6.14	Buffer TE 1X
<b>7</b>	<b>Procedimientos:</b>
	Desinfectar el área de trabajo con etanol al 70%. Trabajar en campana los pasos de lisis (7.1-7.6). Antes de comenzar preparar todos los reactivos del kit como se indica en el inserto del fabricante.
	<b>Para especímenes secos:</b>
7.1	En la cabina de bioseguridad, agregar a los abdómenes 100 µL de buffer de rehidratación, incubar por 20 minutos a temperatura ambiente.
7.2	Quitar el buffer con pipeta y agregar 100 µL de TE 1X, agitar suavemente para lavar el abdomen y centrifugar 10 minutos a 15°C a 2000 rpm.
7.3	Remover el TE con pipeta. Si hubiera un poco de sangre en el fondo del tubo, sacar el buffer extrayendo la menor cantidad de sangre posible.



**Laboratorio de  
Enfermedades Arbovirales  
y Zoonóticas  
CES-UVG/CDC-CAP**

<b>POE #:</b>	WNV-IS003
<b>Revisión #:</b>	1
<b>Página:</b>	3 de 3
<b>Fecha de implementación:</b>	13/06/2008
<b>Revisado/Actualizado:</b>	19/09/2009

<b>Título:</b>	Extracción de ADN de ingesta sanguínea con Kit Qiagen	<b>Aprobado por:</b>	ME Morales-Betoulle, Investigador Principal
<b>Elaborado por:</b>	AS González-Reiche, CM Paiz-Reyes		

7.4	<b>Procesamiento de muestras:</b>
7.5	Agregar 80 µL de PBS a los abdómenes y homogenizar con un pistilo azul. Descartar el pistilo en NaOH 1.0M.
7.6	Agregar a cada tubo 180 µL de buffer <b>ATL</b> y 20 µL de <b>Proteinasa K</b> .
7.7	Agitar con vortex e incubar a 56° C por 1 hora. Hacer un Quick spin.
7.8	Agregar 200 µL de Buffer <b>AL</b> . Agitar con vortex por 15 s. Incubar a 70°C por 10 min. Hacer un <i>quick spin</i> a los tubos
7.9	Agregar 200 µL al 100%. Pasar por el vortex por 15 segundos. Hacer un <i>quick spin</i> para remover las gotas de la tapadera de los tubos.
7.10	Con la pipeta P1000 en 700 µL, agregar la mezcla de cada tubo a una columna limpia, rotulada con el número de muestra. Con cuidado de no mojar el anillo exterior. Cerrarlas y centrifugar 1 min a 8000 rpm.
7.11	Pasar las columnas a un tubo colector incluido en el kit, y descartar el tubo que contiene el filtrado.
7.12	Abrir la columna y agregar 500 µL de <b>AW1</b> sin mojar el anillo exterior. Cerrarlas y centrifugar 1 min a 8000 rpm. Pasar las columnas a un tubo colector incluido en el kit, y descartar el tubo que contiene el filtrado.
7.13	Abrir la columna y agregar 500 µL de <b>AW2</b> sin mojar el anillo exterior. Cerrarlas y centrifugar 4 min a máxima velocidad (13200-14000 rpm).
7.14	Pasar las columnas a un tubo eppendorf de 1.5 mL, limpio y rotulado con el número de muestra. Descartar el tubo que contiene el filtrado.
7.15	Agregar 100 µL de Buffer <b>AE</b> en el centro de la columna con una punta diferente para cada muestra. Incubar a temperatura ambiente por 5 minutos. Centrifugar a 8000 rpm por 1 minuto.
7.16	<b>Almacenamiento y manejo de muestras:</b>




**Laboratorio de  
Enfermedades Arbovirales  
y Zoonóticas  
CES-UVG/CDC-CAP**


<b>POE #:</b>	WNV-IS003
<b>Revisión #:</b>	1
<b>Página:</b>	4 de 4
<b>Fecha de implementación:</b>	13/06/2008
<b>Revisado/Actualizado:</b>	19/09/2009

<b>Título:</b>	Extracción de ADN de ingesta sanguínea con Kit Qiagen	<b>Aprobado por:</b>	ME Morales-Betoulle, Investigador Principal
<b>Elaborado por:</b>	AS González-Reiche, CM Paiz-Reyes		

7.17	Descartar la columna y almacenar las muestras a -20°C o -70°C. Colocar en cajas criogénicas rotuladas "ADN zancudos alimentados ( <i>especie</i> )" y el rango de muestras almacenadas (por ejemplo. GU-1947-01 a 2209-12).
7.18	<b>Limpieza y desinfección de materiales y área de trabajo:</b>
	Desinfectar el área de trabajo con etanol al 70%. Descartar puntas, columnas y tubos en la bolsa de desechos biopeligroso.  Los pistilos se descartan en una solución de NaOH 1.0 M. Se lavan con bastante agua, luego extrán al 5%. Se enjuagan con agua destilada y se pasan por autoclave antes de volver a utilizar.
<b>8</b>	<b>Responsables:</b>
	<b>Personal</b> – Investigadores y estudiantes que realicen el procedimiento. Verificar que todo el material para realizar este POE esté completo y listo.
<b>9</b>	<b>Manejo de registros:</b>
	<b>Anotar en el cuaderno de laboratorio</b> el número de muestras procesadas y el número de identificación de cada muestra. En dónde se almacenó y a qué temperatura. Ingresar en la base de datos los resultados para cada muestra.

 <p style="text-align: center;"><b>Laboratorio de Enfermedades Arbovirales y Zoonóticas CES-UVG/CDC-CAP</b></p>	<b>POE #:</b>	WNV-IS004
	<b>Revisión #:</b>	1
	<b>Página:</b>	1 de 5
	<b>Fecha de implementación:</b>	13/06/2008
	<b>Revisado/Actualizado:</b>	19/09/2009
<b>Título:</b>	PCR ND4 para control de calidad de ADN extraído	<b>Aprobado por:</b> ME Morales-Betoulle, Investigador Principal
<b>Elaborado por:</b>	AS González-Reiche	

<b>1</b>	<b>Propósito:</b>	Verificar la calidad del ADN extraído de los abdómenes de zancudos alimentados.
<b>2</b>	<b>Aplicación:</b>	Ensayo desarrollado para amplificar el fragmento de la subunidad 4 del NADH deshidrogenasa, codificada por el genoma mitocondrial.
<b>3</b>	<b>Principio:</b>	Debido al alto número de copias del genoma mitocondrial por célula, este es un PCR muy robusto, en este caso se utiliza para verificar la calidad de las extracciones de ADN. El producto esperado es de 400 pares de bases.
<b>4</b>	<b>Referencias:</b>	<b>Revisar antes de realizar este procedimiento</b>
	<b>Otros POEs:</b>	WNV-IS002 – Extracción de ADN con DNAzol WNV-IS003 – Extracción de ADN con Kit WNV-IS008 – Electroforesis en gel de Agarosa
	<b>Documentos suplementarios:</b>	- Gorrochotegui-Escalante, N., M. De Lourdes Munoz, I. Fernandez-Salas. 2000. Am. J. Trop. Med. Hyg. 62: 200-209. - Simon, C., F. Frati, A. Beckenbach, B. Crespi, H. Liu, and P. Flook. 1994. Annals of the Entomological Society of America 87 (6): 651-701.
<b>5</b>	<b>Seguridad</b>	
	5.1	Utilizar bata protectora y guantes de nitrilo desechables durante todo el procedimiento.

	<b>Laboratorio de Enfermedades Arbovirales y Zoonóticas CES-UVG/CDC-CAP</b>	<b>POE #:</b>	WNV-IS004
		<b>Revisión #:</b>	1
		<b>Página:</b>	2 de 5
		<b>Fecha de implementación:</b>	13/06/2008
		<b>Revisado/Actualizado:</b>	19/09/2009
<b>Título:</b>	PCR ND4 para control de calidad de ADN extraído	<b>Aprobado por:</b>	ME Morales-Betoulle, Investigador Principal
<b>Elaborado por:</b>	AS González-Reiche		

<b>6</b>	<b>Equipos, materiales y reactivos:</b>	
6.1	ADN extraído de abdómenes de zancudos alimentados	
6.2	Agua DEPC (Invitrogen)	
6.3	Buffer de reacción 5X GoTaq® verde o sin color (Promega)	
6.4	dNTPs 250 µM c/u	
6.5	Cebadores ND4for (100pmol/µL): 5'-GTDYATTTATGATTRCCTAA-3' (Tm=44.4°C) y ND4rev (100pmol/µL): 5'-CTTCGDCTTCCWADWCGTTC-3' (Tm=53.3°C)	
6.6	Taq (GoTaq DNA Polymerase, Promega)	
6.7	Hielo	
6.8	Tubos para microcentrífuga de 1.5 mL o tubo cónico de 15 mL (según la cantidad de master mix a preparar)	
6.9	Placas o tubos con tapadera, para PCR convencional	
6.10	Gradilla fría, gradilla para placa y para master mix	
6.11	Etanol al 70% para limpieza y desinfección	
6.12	Puntas bloqueadas, estériles, libres de ARNasas y ADNasas, exclusivas de PCR (p1000, p200, p100, p20, p10)	
6.13	Guantes, kimwipes, marcador permanente de punta fina, etc.	
<b>7</b>	<b>Procedimientos:</b>	
	<b>Preparación de materiales</b>	
7.1	Desinfectar el área de trabajo con etanol al 70% antes de comenzar a trabajar.	
7.2	Desinfectar la campana de PCR y encender la luz UV por 10 min.	
7.3	Descongelar las muestras de ADN y el control positivo sobre hielo.	



**Laboratorio de  
Enfermedades Arbovirales  
y Zoonóticas  
CES-UVG/CDC-CAP**

**POE #:** WNV-IS004

**Revisión #:** 1

**Página:** 3 de 5

**Fecha de  
implementación:** 13/06/2008

**Revisado/Actualizado:** 19/09/2009

**Título:** PCR ND4 para control de  
calidad de ADN extraído

**Aprobado por:** ME Morales-  
Betoulle,  
Investigador  
Principal

**Elaborado  
por:** AS González-Reiche

7.4

Encender termociclador para PCR convencional Nyx Technik y cargar el programa "ND4", ver sección 6.10.

**Procedimiento PCR:**

7.5

Preparar Master Mix dentro de la campana de PCR en suficiente cantidad para el número de muestras a procesar (Para el cálculo de volúmenes de Master mix, agregar una reacción por cada 10 muestras) incluir en el cálculo el control positivo (ADN de zancudo *Culex*) y el control negativo (NTC):

Reactivo	1X	nX
5X	4.0 µL	
dNTPs	0.5 µL	
ND4for	1.0 µL	
ND4rev	1.0 µL	
Taq	1.0 Unidad	
dH <sub>2</sub> O	para completar volumen de reacción de 20 µL	
Templado (ADN)	1.0 µL	

7.6

Agregar 19 µL de Master mix a cada tubo o pozo de la placa sobre la gradilla fría.

7.7

Colocar los tubos o la placa de PCR en la gradilla plástica colocada sobre hielo.

7.8

Guardar los reactivos del Master Mix a -20°C

7.9

Fuera de la campana de PCR, agregar el ADN. Cerrar los tubos y colocar en el termociclador, para iniciar el programa de amplificación:



**Laboratorio de  
Enfermedades Arbovirales  
y Zoonóticas  
CES-UVG/CDC-CAP**

<b>POE #:</b>	WNV-IS004
<b>Revisión #:</b>	1
<b>Página:</b>	4 de 5
<b>Fecha de implementación:</b>	13/06/2008
<b>Revisado/Actualizado:</b>	19/09/2009

<b>Título:</b>	PCR ND4 para control de calidad de ADN extraído	<b>Aprobado por:</b>	ME Morales-Betoulle, Investigador Principal
<b>Elaborado por:</b>	AS González-Reiche		

Paso	Temperatura	Tiempo
1	95°C	3 min
2	92°C	30 seg
3	48°C	60 seg
4	72°C	40 seg
5	Volver a pasos 2 a 4, 9X	
6	92°C	30 seg
7	52°C	35 seg
8	72°C	40 seg
9	Volver a pasos 6 a 8, 41X	
10	72°C	5 min
11	4°C	Hold
12	end	

**Almacenamiento y manejo de muestras:**

- |      |   |
|------|---|
| 7.10 | Almacenar nuevamente los templados de ADN a -70°C. Los productos de PCR se almacenan a 4°C hasta que se realizar la electroforesis. |
| 7.11 | Visualizar los productos de amplificación en un gel de agarosa al 2% (Ver. Sección 9.1).  |

**Limpieza y desinfección de materiales y área de trabajo:**



**Laboratorio de  
Enfermedades Arbovirales  
y Zoonóticas  
CES-UVG/CDC-CAP**

**POE #:** WNV-IS004

**Revisión #:** 1

**Página:** 5 de 5

**Fecha de  
implementación:** 13/06/2008

**Revisado/Actualizado:** 19/09/2009

**Título:**

PCR ND4 para control de  
calidad de ADN extraído

**Aprobado por:**

ME Morales-  
Betoulle,  
Investigador  
Principal

**Elaborado  
por:**

AS González-Reiche

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

**8 Responsables:**

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

**9 Manejo de registros:**

**Anotar en el cuaderno de laboratorio** el número de muestras procesadas, el mapa si se trabajo con placa con el número de identificación de cada muestra. Anotar el detalle de los cálculos para la preparación de Master mix. Ingresar en la base de datos los resultados para cada muestra.



**Laboratorio de  
Enfermedades Arbovirales  
y Zoonóticas  
CES-UVG/CDC-CAP**

<b>POE #:</b>	WNV-IS005
<b>Revisión #:</b>	1
<b>Página:</b>	1 de 5
<b>Fecha de implementación:</b>	13/06/2008
<b>Revisado/Actualizado:</b>	19/09/2009

<b>Título:</b>	PCR para identificación de ingestas sanguíneas ave-mamífero	<b>Aprobado por:</b> ME Morales-Betoulle, Investigador Principal
<b>Elaborado por:</b>	AS González-Reiche	

<b>1</b>	<b>Propósito:</b>
	Identificar el hospedero (ave o mamífero) del contenido sanguíneo del abdomen de los zancudos alimentados.
<b>2</b>	<b>Aplicación:</b>
	Los cebadores utilizados en esta reacción fueron diseñados para amplificar específicamente ADN mitocondrial del gen del citocromo b, ya sea de mamífero o ave, a partir de las ingestas sanguíneas de zancudos.
<b>3</b>	<b>Principio:</b>
	Los cebadores para aves de Ngo & Kramer (1) amplifican para un producto de 600 pb, tanto para mamíferos como aves, y también para un producto secundario adicional de ~290 pb solo para templados de ADN de origen aviar. Por otro lado, los cebadores para mamíferos amplifican para un producto único de 600 pb sólo para templados de origen Mamífero. Los cebadores para aves de Cicero & Johnson (2) producen un producto de 508 pb tanto para los templados de origen aviar como mamífero. Los templados de origen aviar se pueden diferenciar de los de origen mamífero al comparar los productos para ambos sets de cebadores. Estos sets de cebadores no se pueden mezclar en una reacción multiplex, por lo que tienen que prepararse las reacciones por separado, pero ambas con el mismo programa de amplificación.
<b>4</b>	<b>Referencias:</b>
	<b>Revisar antes de realizar este procedimiento</b>
4.1	<b>Otros POEs:</b> WNV-IS002 – Extracción de ADN con DNAzol WNV-IS003 – Extracción de ADN con Kit WNV-IS004 – PCR ND4 control de calidad WNV-IS008 – Electroforesis en gel de Agarosa

	<b>Laboratorio de Enfermedades Arbovirales y Zoonóticas CES-UVG/CDC-CAP</b>	<b>POE #:</b> WNV-IS005
		<b>Revisión #:</b> 1
		<b>Página:</b> 2 de 5
		<b>Fecha de implementación:</b> 13/06/2008
		<b>Revisado/Actualizado:</b> 19/09/2009
<b>Título:</b>	PCR para identificación de ingestas sanguíneas ave-mamífero	<b>Aprobado por:</b> ME Morales-Betoulle, Investigador Principal
<b>Elaborado por:</b>	AS González-Reiche	

	4.2	<b>Documentos suplementarios:</b>  1. Ngo, K.A. and L.D. Kramer. 2003. J. Med. Entomol. 40: 215-222. 2. Cicero C., and N. K. Johnson. 2001. Mol. Phyl. Evol. 20: 27-40.
<b>5</b>	<b>Seguridad</b>	
	5.1	Utilizar bata protectora y guantes desechables durante todo el procedimiento.
<b>6</b>	<b>Equipos, materiales y reactivos:</b>	
	6.1	ADN extraído de abdómenes de zancudos alimentados
	6.2	ADN de gallina, y cabra o algún otro mamífero.
	6.3	Agua DEPC (Invitrogen)
	6.4	Buffer de reacción 5X GoTaq® verde o sin color (Promega)
	6.5	dNTPs 250 µM c/u
	6.6	Cebador Forward (100pmol/µL):  <u>Ngo &amp; Kramer</u> Mammal forward: 5'-CGAAGCTTGATATGAAAAACCATCGTTG-3' Avian forward: 5'-GACTGTGACAAAATCCCNTTCCA-3'  <u>Cicero &amp; Johnson</u> Avian forward: 5'-GACTGTGACAAAATCCCNTTCCA-3'

 <p style="text-align: center;"><b>Laboratorio de Enfermedades Arbovirales y Zoonóticas CES-UVG/CDC-CAP</b></p>	<b>POE #:</b>	WNV-IS005
	<b>Revisión #:</b>	1
	<b>Página:</b>	3 de 5
	<b>Fecha de implementación:</b>	13/06/2008
	<b>Revisado/Actualizado:</b>	19/09/2009
<b>Título:</b>	PCR para identificación de ingestas sanguíneas ave-mamífero	<b>Aprobado por:</b> ME Morales-Betoulle, Investigador Principal
<b>Elaborado por:</b>	AS González-Reiche	

6.7	<p>Cebador Reverse (100pmol/μL):</p> <p><u>Ngo &amp; Kramer</u></p> <p>Mammal reverse: 5'-TGTAGTTRTCWGGGTCHCCTA-3'</p> <p>Avian reverse: 5'-GGTCTTCATCTYHGGYTTACAAGAC-3'</p> <p><u>Cicero &amp; Johnson</u></p> <p>Avian reverse: 5'-GGTCTTCATCTYHGGYTTACAAGAC-3'</p>
6.8	Taq (GoTaq DNA Polymerase, Promega)
6.9	Hielo
6.10	Tubos para microcentrifuga de 1.5 mL o tubo cónico de 15 mL (según la cantidad de master mix a preparar)
6.11	Placas o tubos con tapadera, para PCR convencional
6.12	Gradilla fría, gradilla para placa y para master mix
6.13	Etanol al 70% para limpieza y desinfección
6.14	Puntas bloqueadas, estériles, libres de ARNasas y ADNasas, exclusivas de PCR (p1000, p200, p100, p20, p10)
6.15	Guantes, kimwipes, marcador permanente de punta fina, etc.
<b>7</b>	<b>Procedimientos:</b>
	<b>Preparación de materiales</b>
7.1	Desinfectar el área de trabajo con etanol al 70% antes de comenzar a trabajar.
7.2	Desinfectar la campana de PCR y encender la luz UV por 10 min.
7.3	Descongelar las muestras de ADN y el control positivo sobre hielo.

	<b>Laboratorio de Enfermedades Arbovirales y Zoonóticas CES-UVG/CDC-CAP</b>	<b>POE #:</b>	WNV-IS005
		<b>Revisión #:</b>	1
		<b>Página:</b>	4 de 5
		<b>Fecha de implementación:</b>	13/06/2008
		<b>Revisado/Actualizado:</b>	19/09/2009
<b>Título:</b>	PCR para identificación de ingestas sanguíneas ave-mamífero	<b>Aprobado por:</b>	ME Morales-Betoulle, Investigador Principal
<b>Elaborado por:</b>	AS González-Reiche		

7.4	Encender termociclador#3 para PCR convencional Nyx Technik y cargar el programa "MAMAVI" para cebadores aviares o "MAMAVI_53" para cebadores mamíferos Ver sección 7.10.
-----	--

**Procedimiento PCR:**

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

Reactivo	1X	nX
5X	5.0 µL	
dNTPs	1.0 µL	
Forward	0.5 µL	
Reverse	0.5 µL	
Taq	1.0 Unidad	
dH <sub>2</sub> O	para completar volumen de reacción de 25 µL *	
Templado (ADN)	1.0 µL controles, 2.0 µL muestra	

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

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



**Laboratorio de  
Enfermedades Arbovirales  
y Zoonóticas  
CES-UVG/CDC-CAP**

<b>POE #:</b>	WNV-IS005
<b>Revisión #:</b>	1
<b>Página:</b>	5 de 5
<b>Fecha de implementación:</b>	13/06/2008
<b>Revisado/Actualizado:</b>	19/09/2009

<b>Título:</b>	PCR para identificación de ingestas sanguíneas ave-mamífero	<b>Aprobado por:</b> ME Morales-Betoulle, Investigador Principal
<b>Elaborado por:</b>	AS González-Reiche	

7.10	Paso	Temperatura	Tiempo
	1	95°C	5 min
	2	94°C	30 seg
	3*	55°C	30 seg
	4	72°C	90 seg
	5	Volver a pasos 2 a 4, 34X	
	6	72°C	4 min
	7	4°C	Hold

\*Para programa "MAMAVI\_53" este paso se realiza a 53.4°C

**Almacenamiento y manejo de muestras:**

7.11 Almacenar nuevamente los templados de ADN a -70°C. Los productos de PCR se almacenan a 4°C hasta que se realizar la electroforesis.

7.12 Visualizar los productos de amplificación en un Gel de Agarosa al 2% (Sección 9.1).

**Limpieza y desinfección de materiales y área de trabajo:**

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

**8 Responsables:**

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

**9 Manejo de registros:**

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



**Laboratorio de  
Enfermedades Arbovirales  
y Zoonóticas  
CES-UVG/CDC-CAP**

<b>POE #:</b>	WNV-IS006
<b>Revisión #:</b>	1
<b>Página:</b>	1 de 5
<b>Fecha de implementación:</b>	13/06/2008
<b>Revisado/Actualizado:</b>	19/09/2009

**Título:** PCR múltiplex para identificación de ingesta sanguínea de hospederos mamíferos

**Aprobado por:** ME Morales-Betoulle, Investigador Principal

**Elaborado por:** AS González-Reiche

**1 Propósito:**

Identificar la especie del hospedero mamífero (Humano, vaca, perro, cerdo, cabra) del contenido sanguíneo del abdomen de los zancudos alimentados.

**2 Aplicación:**

Las muestras de ADN genómico de las ingestas sanguíneas de zancudos alimentados que presentan amplificación para la reacción de PCR MAMAVI (ver sección 9.1) e identificadas como mamíferos, se utilizan para esta reacción.

**3 Principio:**

Este ensayo de PCR múltiplex fue desarrollado para diferenciar entre potenciales hospederos mamíferos de las ingestas sanguíneas de *Anopheles arabiensis* (1). Se amplifican fragmentos especie-específicos del gen del citocromo b, del genoma mitocondrial. Debido al alto número de copias por célula del genoma mitocondrial, este es un PCR robusto que puede ser utilizado en muestras de sangre de mamíferos con células no nucleadas. Es ideal para concentraciones bajas de templado de ADN como las que se encuentran en las ingestas sanguíneas de los zancudos alimentados. De manera general se utiliza un cebador "Forward" especie-específico y un cebador Reverse Universal (para los diferentes mamíferos). Se puede utilizar también una pareja de cebadores específicos de ganado ver Tabla sección 6.6.

**4 Referencias:**

**Revisar antes de realizar este procedimiento**

**4.1 Otros POEs:**  
WNV-IS005 – PCR MAMAVI  
WNV-IS008 – Electroforesis en gel de Agarosa

**4.2 Documentos suplementarios:**  
1. Kent, R.J. & D.E. Norris. 2005. Am. J. Trop. Med. Hyg. 73(2):336-342.



**Laboratorio de  
Enfermedades Arbovirales  
y Zoonóticas  
CES-UVG/CDC-CAP**

**POE #:** WNV-IS006  
**Revisión #:** 1  
**Página:** 2 de 5  
**Fecha de implementación:** 13/06/2008  
**Revisado/Actualizado:** 19/09/2009

**Título:** PCR múltiple para identificación de ingesta sanguínea de hospederos mamíferos

**Aprobado por:** ME Morales-Betoulle, Investigador Principal

**Elaborado por:** AS González-Reiche

**5 Seguridad**

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

**6 Equipos, materiales y reactivos:**

6.1 ADN extraído de abdómenes de zancudos alimentados

6.2 ADN de mamíferos de especies a identificar.

6.3 Agua DEPC (Invitrogen)

6.4 Buffer de reacción 5X GoTaq® verde o sin color (Promega)

6.5 dNTPs 250 µM c/u

Cebadores (100pmol/µL):

Cebador	Secuencia 5'- 3'	Tamaño de producto con UNREV1025 (pb)
Pig573F	CCTCGCAGCCGTACATCTC	453
Human741F	GGCTTACTTCTCTTCATTCTCTCCT	334
Goat894F	CCTAATCTTAGTACTTGTACCCTTCCTC	132
Dog368F	GGAATTGTACTATTATTTCGCAACCAT	680
Cow121F	CATCGGCACAAATTTAGTCC	561
UNREV1025	GGTTGTCCTCCAATTCATGTTA	-
UNFOR403	TGAGGACAAATATCATTCTGAGG	623
Cow371R	GAGCTAGAATTAGTAAGAGGGCC	313 con cebador UNFOR403

6.7 Taq polimerasa (GoTaq DNA Polymerase, Promega)

6.8 Hielo

6.9 Tubos para microcentrifuga de 1.5 mL o tubo cónico de 15 mL (según la cantidad de master mix a preparar)

6.10 Placas o tubos con tapadera, para PCR convencional



**Laboratorio de  
Enfermedades Arbovirales  
y Zoonóticas  
CES-UVG/CDC-CAP**

<b>POE #:</b>	WNV-IS006
<b>Revisión #:</b>	1
<b>Página:</b>	3 de 5
<b>Fecha de implementación:</b>	13/06/2008
<b>Revisado/Actualizado:</b>	19/09/2009

**Título:**

PCR múltiplex para identificación de ingesta sanguínea de hospederos mamíferos

**Aprobado por:**

ME Morales-Betoulle,  
Investigador Principal

**Elaborado por:**

AS González-Reiche

6.11	Gradilla fría, gradilla para placa y para master mix
6.12	Etanol al 70% para limpieza y desinfección
6.13	Puntas bloqueadas, estériles, libres de ARNasas y ADNasas, exclusivas de PCR (p1000, p200, p100, p20, p10)
6.14	Guantes, kimwipes, marcador permanente de punta fina, etc.
<b>7</b>	<b>Procedimientos:</b>
	<b>Preparación de materiales</b>
7.1	Desinfectar el área de trabajo con etanol al 70% antes de comenzar a trabajar.
7.2	Desinfectar la campana de PCR y encender la luz UV por 10 min.
7.3	Descongelar las muestras de ADN y el control positivo sobre hielo.
7.4	Encender termociclador #3 para PCR convencional (Nyx Technik) y cargar el programa "BLOOD_57"
	<b>Procedimiento PCR:</b>
7.5	Preparar Master Mix dentro de la campana de PCR en suficiente cantidad para el número de muestras a procesar (Para el cálculo de volúmenes de Master mix, agregar una reacción por cada 10 muestras) incluir en el cálculo los controles positivos (ADN de especies a identificar) y el control negativo (NTC):



**Laboratorio de  
Enfermedades Arbovirales  
y Zoonóticas  
CES-UVG/CDC-CAP**

<b>POE #:</b>	WNV-IS006
<b>Revisión #:</b>	1
<b>Página:</b>	4 de 5
<b>Fecha de implementación:</b>	13/06/2008
<b>Revisado/Actualizado:</b>	19/09/2009

<b>Título:</b>	PCR múltiplex para identificación de ingesta sanguínea de hospederos mamíferos	<b>Aprobado por:</b>	ME Morales-Betoulle, Investigador Principal
<b>Elaborado por:</b>	AS González-Reiche		

Reactivo	1X	nX
5X	5.0 µL	
dNTPs	1.0 µL	
UNREV1025	0.5 µL	
Pig573F	0.5 µL	
Human741F	0.5 µL	
Goat894F	0.5 µL	
Dog368F	0.5 µL	
Cow121F	0.5 µL	
Taq	1.0 Unidad	
dH <sub>2</sub> O	para completar volumen de reacción de 25 µL	
Templado (ADN)	1.0 µL controles, 2.0 µL muestra	

7.6 Agregar 23 µL de Master mix a cada tubo o pozo de la placa sobre la gradilla fría.

7.7 Colocar los tubos o la placa de PCR en la gradilla plástica colocada sobre hielo.

7.8 Guardar los reactivos del Master Mix a -20°C

7.9 Fuera de la campana de PCR, agregar el templado de ADN, incluyendo los controles. Cerrar los tubos y colocar en el termociclador, para iniciar el programa de amplificación:

Paso	Temperatura	Tiempo
1	95°C	5 min
2	95°C	1 min
3	57°C	1 min
4	72°C	1 min
5	Volver a pasos 2 a 4, 29X	
6	72°C	7 min
7	4°C	Hold



**Laboratorio de  
Enfermedades Arbovirales  
y Zoonóticas  
CES-UVG/CDC-CAP**

<b>POE #:</b>	WNV-IS006
<b>Revisión #:</b>	1
<b>Página:</b>	5 de 5
<b>Fecha de implementación:</b>	13/06/2008
<b>Revisado/Actualizado:</b>	19/09/2009

**Título:** PCR múltiple para identificación de ingesta sanguínea de hospederos mamíferos

**Aprobado por:**

ME Morales-Betoulle,  
Investigador Principal

**Elaborado por:** AS González-Reiche

**Almacenamiento y manejo de muestras:**

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

**Limpieza y desinfección de materiales y área de trabajo:**

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

**8 Responsables:**


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

**9 Manejo de registros:**


- |     |  |
|-----|--|
| 9.1 | Anotarse en el cuaderno de registro de usuarios del termociclador.   |
| 9.2 | <b>Anotar en el cuaderno de laboratorio</b> el número de muestras procesadas, el mapa si se trabajo con placa con el número de identificación de cada muestra. |
| 9.3 | Anotar el detalle de los cálculos para la preparación de Master mix.   |
| 9.4 | Ingresar en la base de datos los resultados para cada muestra (K:\WNV\ArboEpiMosquitos Ingesta Sanguinea.mdb).   |

 <p style="text-align: center;"><b>Laboratorio de Enfermedades Arbovirales y Zoonóticas CES-UVG/CDC-CAP</b></p>	<b>POE #:</b>	WNV-IS007
	<b>Revisión #:</b>	1
	<b>Página:</b>	1 de 5
	<b>Fecha de implementación:</b>	13/06/2008
	<b>Revisado/Actualizado:</b>	19/09/2009
<b>Título:</b>	PCR para identificación de ingesta sanguínea de gallinas en zancudos alimentados	<b>Aprobado por:</b> ME Morales-Betoulle, Investigador Principal
<b>Elaborado por:</b>	AS González-Reiche	

<b>1</b>	<b>Propósito:</b>
	Identificar si la especie del hospedero aviar del contenido sanguíneo del abdomen de los zancudos alimentados es <i>Gallus gallus</i> .
<b>2</b>	<b>Aplicación:</b>
	Las muestras de ADN genómico de las ingestas sanguíneas de zancudos alimentados que presentan amplificación para la reacción de PCR MAMAVI (ver sección 9.1) e identificadas como aves, se utilizan para esta reacción.
<b>3</b>	<b>Principio:</b>
	Este ensayo de PCR fue desarrollado para identificar a Gallina común y Gallina de Guinea de las ingestas sanguíneas de <i>Anopheles arabiensis</i> (1). Se amplifican fragmentos especie-específicos del gen del citocromo b, del genoma mitocondrial. Debido al alto número de copias por célula del genoma mitocondrial, este es un PCR robusto, ideal para concentraciones bajas de templado de ADN como las que se encuentran en las ingestas sanguíneas de los zancudos alimentados.
<b>4</b>	<b>Referencias:</b>
	<b>Revisar antes de realizar este procedimiento</b>
4.1	<b>Otros POEs:</b> WNV-IS005 – PCR MAMAVI WNV-IS006 – PCR Multiplex Ingesta Sanguínea WNV-IS008 – Electroforesis en gel de Agarosa

	<b>Laboratorio de Enfermedades Arbovirales y Zoonóticas CES-UVG/CDC-CAP</b>	<b>POE #:</b>	WNV-IS007
		<b>Revisión #:</b>	1
		<b>Página:</b>	2 de 5
		<b>Fecha de implementación:</b>	13/06/2008
		<b>Revisado/Actualizado:</b>	19/09/2009
<b>Título:</b>	PCR para identificación de ingesta sanguínea de gallinas en zancudos alimentados	<b>Aprobado por:</b>	ME Morales-Betoulle, Investigador Principal
<b>Elaborado por:</b>	AS González-Reiche		

		<b>Documentos suplementarios:</b>
4.2		<p>1. Kent, R.J., P.E. Thuma, S. Mharakurwa &amp; D.E. Norris. 2007. Seasonality, blood feeding behavior, and transmission of <i>Plasmodium falciparum</i> by <i>Anopheles arabiensis</i> after an extended drought in southern Zambia. Am. J. Trop. Med. Hyg. 76(2):267-274.</p> <p>2. Kent, R.J. &amp; D.E. Norris. 2005. Identification of mammalian blood meals in mosquitoes by a multiplexed polymerase chain reaction targeting cytochrome b. Am. J. Trop. Med. Hyg. 73(2):336-342.</p>
<b>5</b>	<b>Seguridad</b>	
5.1	Utilizar bata protectora y guantes desechables durante todo el procedimiento.	
<b>6</b>	<b>Equipos, materiales y reactivos:</b>	
6.1	ADN extraído de abdómenes de zancudos alimentados	
6.2	ADN de mamíferos de especies a identificar.	
6.3	Agua DEPC (Invitrogen)	
6.4	Buffer de reacción 5X GoTaq® verde o sin color (Promega)	
6.5	dNTPs 250 µM c/u	
6.6	Cebadores (100pmol/µL): Chick1123R: 5'-GAAGAGGATAAGTAGGATGGTGAAG-3' UNFOR1029: 5'-TAACCTGAATCGGAAGCCAACC-3'	
6.7	Taq polimerasa (GoTaq DNA Polymerase, Promega)	
6.8	Hielo	

 <p style="text-align: center;"><b>Laboratorio de Enfermedades Arbovirales y Zoonóticas CES-UVG/CDC-CAP</b></p>	<b>POE #:</b>	WNV-IS007
	<b>Revisión #:</b>	1
	<b>Página:</b>	3 de 5
	<b>Fecha de implementación:</b>	13/06/2008
	<b>Revisado/Actualizado:</b>	19/09/2009
<b>Título:</b>	PCR para identificación de ingesta sanguínea de gallinas en zancudos alimentados	<b>Aprobado por:</b> ME Morales-Betoulle, Investigador Principal
<b>Elaborado por:</b>	AS González-Reiche	

	6.9	Tubos para microcentrífuga de 1.5 mL o tubo cónico de 15 mL (según la cantidad de master mix a preparar)
	6.10	Placas o tubos con tapadera, para PCR convencional
	6.11	Gradilla fría, gradilla para placa y para master mix
	6.12	Etanol al 70% para limpieza y desinfección
	6.13	Puntas bloqueadas, estériles, libres de ARNasas y ADNasas, exclusivas de PCR (p1000, p200, p100, p20, p10)
	6.14	Guantes, kimwipes, marcador permanente de punta fina, etc.
<b>7</b>	<b>Procedimientos:</b>	
	<b>Preparación de materiales</b>	
	7.1	Desinfectar el área de trabajo con etanol al 70% antes de comenzar a trabajar.
	7.2	Desinfectar la campana de PCR y encender la luz UV por 10 min.
	7.3	Descongelar las muestras de ADN y el control positivo sobre hielo.
	7.4	Encender termociclador #3 para PCR convencional (Nyx Technik) y cargar el programa "BLOOD"
	<b>Procedimiento PCR:</b>	
	7.5	Preparar Master Mix dentro de la campana de PCR en suficiente cantidad para el número de muestras a procesar (Para el cálculo de volúmenes de Master mix, agregar una reacción por cada 10 muestras) incluir en el cálculo los controles positivos (ADN de especies a identificar) y el control negativo (NTC):



**Laboratorio de  
Enfermedades Arbovirales  
y Zoonóticas  
CES-UVG/CDC-CAP**

**POE #:** WNV-IS007  
**Revisión #:** 1  
**Página:** 4 de 5  
**Fecha de implementación:** 13/06/2008  
**Revisado/Actualizado:** 19/09/2009

**Título:** PCR para identificación de ingesta sanguínea de gallinas en zancudos alimentados

**Aprobado por:** ME Morales-Betoulle, Investigador Principal

**Elaborado por:** AS González-Reiche

Reactivo	1X	nX
5X	5.0 µL	
dNTPs	1.0 µL	
UNFOR1029	0.5 µL	
Chick1123R	0.5 µL	
Taq	1.0 Unidad	
dH <sub>2</sub> O	para completar volumen de reacción de 25 µL	
Templado (ADN)	1.0 µL controles, 2.0 µL muestra	

7.6 Agregar 23 µL de Master mix a cada tubo o pozo de la placa sobre la gradilla fría.

7.7 Colocar los tubos o la placa de PCR en la gradilla plástica colocada sobre hielo.

7.8 Guardar los reactivos del Master Mix a -20°C

7.9 Fuera de la campana de PCR, agregar el templado de ADN, incluyendo los controles. Cerrar los tubos y colocar en el termociclador, para iniciar el programa de amplificación:

Paso	Temperatura	Tiempo
1	95°C	5 min
2	95°C	1 min
3	58°C	1 min
4	72°C	1 min
5	Volver a pasos 2 a 4, 29X	
6	72°C	7 min
7	4°C	Hold

**Almacenamiento y manejo de muestras:**



**Laboratorio de  
Enfermedades Arbovirales  
y Zoonóticas  
CES-UVG/CDC-CAP**

**POE #:** WNV-IS007

**Revisión #:** 1

**Página:** 5 de 5

**Fecha de  
implementación:** 13/06/2008

**Revisado/Actualizado:** 19/09/2009

**Título:** PCR para identificación de ingesta sanguínea de gallinas en zancudos alimentados

**Aprobado por:** ME Morales-Betoulle,  
Investigador Principal

**Elaborado por:** AS González-Reiche

7.11

Almacenar nuevamente los templados de ADN a  $-70^{\circ}\text{C}$ . Los productos de PCR se almacenan a  $4^{\circ}\text{C}$  hasta que se realizar la electroforesis.

7.12

Visualizar los productos de amplificación en un Gel de Agarosa al 2% (Ver. Sección 9.1).

**Limpieza y desinfección de materiales y área de trabajo:**

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

**8 Responsables:**

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

**9 Manejo de registros:**

9.1

Anotarse en el cuaderno de registro de usuarios del termociclador.

9.2

Anotar en el cuaderno de laboratorio el número de muestras procesadas, el mapa si se trabajo con placa con el número de identificación de cada muestra.

9.3

Anotar el detalle de los cálculos para la preparación de Master mix.

9.4


Ingresa en la base de datos los resultados para cada muestra (K:\WNV\ArboEpiMosquitos Ingesta Sanguinea.mdb).

	<b>Laboratorio de Enfermedades Arbovirales y Zoonóticas CES-UVG/CDC-CAP</b>	<b>POE #:</b> WNV-IS008
		<b>Revisión #:</b> 14
		<b>Página:</b> 1 de 4
		<b>Fecha de implementación:</b> 13/06/2008
		<b>Revisado/Actualizado:</b> 19/09/2009
<b>Título:</b> Electroforesis en gel de agarosa	<b>Aprobado por:</b> ME Morales-Betoulle, Investigador Principal	
<b>Elaborado por:</b> AS González-Reiche		


<b>1</b>	<b>Propósito:</b>
	Separar e identificar los fragmentos de ADN productos de PCR.
<b>2</b>	<b>Aplicación:</b>
	Los productos de PCR se pueden visualizar e identificar al comparar el tamaño de las bandas de los productos obtenidos con el tamaño de las bandas de los controles positivos. Este procedimiento se utiliza para la identificación de los hospederos de ingesta sanguínea de zancudos alimentados. También es el procedimiento utilizado para la detección de productos de RT-PCR para flavivirus.
<b>3</b>	<b>Principio:</b>
	La electroforesis en gel de agarosa teñido con bromuro de etidio (EtBr) se utiliza para la visualización directa de los fragmentos de ADN. El colorante se intercala entre los pares de bases de los ácidos nucleicos y fluoresce (560 nm) cuando se expone a luz UV. El bromuro de etidio se agrega al gel, antes de correr la electroforesis para poder monitorear la separación de los fragmentos hasta la resolución deseada (1).
<b>4</b>	<b>Referencias:</b>
	<b>Revisar ANTES de realizar este procedimiento</b>
4.1	<b>Otros POEs:</b> WNV-IS004 a 7 – PCRs ingesta sanguínea WNV-003 – RT-PCR Flavivirus
4.2	<b>Documentos suplementarios:</b> 1. Voytas, D. 2000. Resolution and recovery of large DNA fragments, in Current protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, inc.: 2.5a.1-2.5a.9. Disponible en <a href="http://intranet.cdc.gov/ic/EResources/EBooks.html">http://intranet.cdc.gov/ic/EResources/EBooks.html</a> 2. MSDS Bromuro de etidio

 <p style="text-align: center;"><b>Laboratorio de Enfermedades Arbovirales y Zoonóticas CES-UVG/CDC-CAP</b></p>	<b>POE #:</b>	WNV-IS008
	<b>Revisión #:</b>	14
	<b>Página:</b>	2 de 4
	<b>Fecha de implementación:</b>	13/06/2008
	<b>Revisado/Actualizado:</b>	19/09/2009
<b>Título:</b>	Electroforesis en gel de agarosa	<b>Aprobado por:</b> ME Morales-Betoulle, Investigador Principal
<b>Elaborado por:</b>	AS González-Reiche	

<b>5</b>	<b>Seguridad</b>	
5.1	<p><b>El Bromuro de Etidio es un reactivo peligroso al contacto con la piel, ojos y por ingestión e inhalación, con potencial mutágeno, cancerígeno y teratógeno.</b> Utilizar bata protectora desechable, exclusiva para manejo de bromuro de etidio, y doble par de guantes desechables durante todo el procedimiento.</p>	
5.2	<p>Manejar el material contaminado con Bromuro de Etidio únicamente en las áreas señaladas para este fin.</p>	
5.3	<p>La luz UV causa daño en los ojos y en la piel expuesta. Evitar la exposición directa o utilizar gafas protectoras durante el trabajo con luz UV.</p>	
<b>6</b>	<b>Materiales y reactivos:</b>	
6.1	Agarosa	
6.2	Buffer TBE 1X	
6.3	Solución de Bromuro de Etidio	
6.4	Puntas limpias p10	
6.5	Marcador molecular 100pb (Promega)	
6.6	Buffer de carga (Promega)	
6.7	Parafilm, guantes, kimwipes, etc.	
<b>7</b>	<b>Procedimientos:</b>	
<b>Preparación de materiales</b>		
7.1	<p>Para la cámara "Run One" (Lab II1-114) preparar 60 mL de gel agregando 1.2 g de agarosa.</p>	
7.2	<p>Colocar en el microondas por 2 minutos. Mientras tanto armar la plataforma del gel colocándo los peines.</p>	

	<b>Laboratorio de Enfermedades Arbovirales y Zoonóticas CES-UVG/CDC-CAP</b>		<b>POE #:</b>	WNV-IS008
			<b>Revisión #:</b>	14
			<b>Página:</b>	3 de 4
			<b>Fecha de implementación:</b>	13/06/2008
			<b>Revisado/Actualizado:</b>	19/09/2009
<b>Título:</b>	Electroforesis en gel de agarosa		<b>Aprobado por:</b>	ME Morales-Betoulle, Investigador Principal
<b>Elaborado por:</b>	AS González-Reiche			

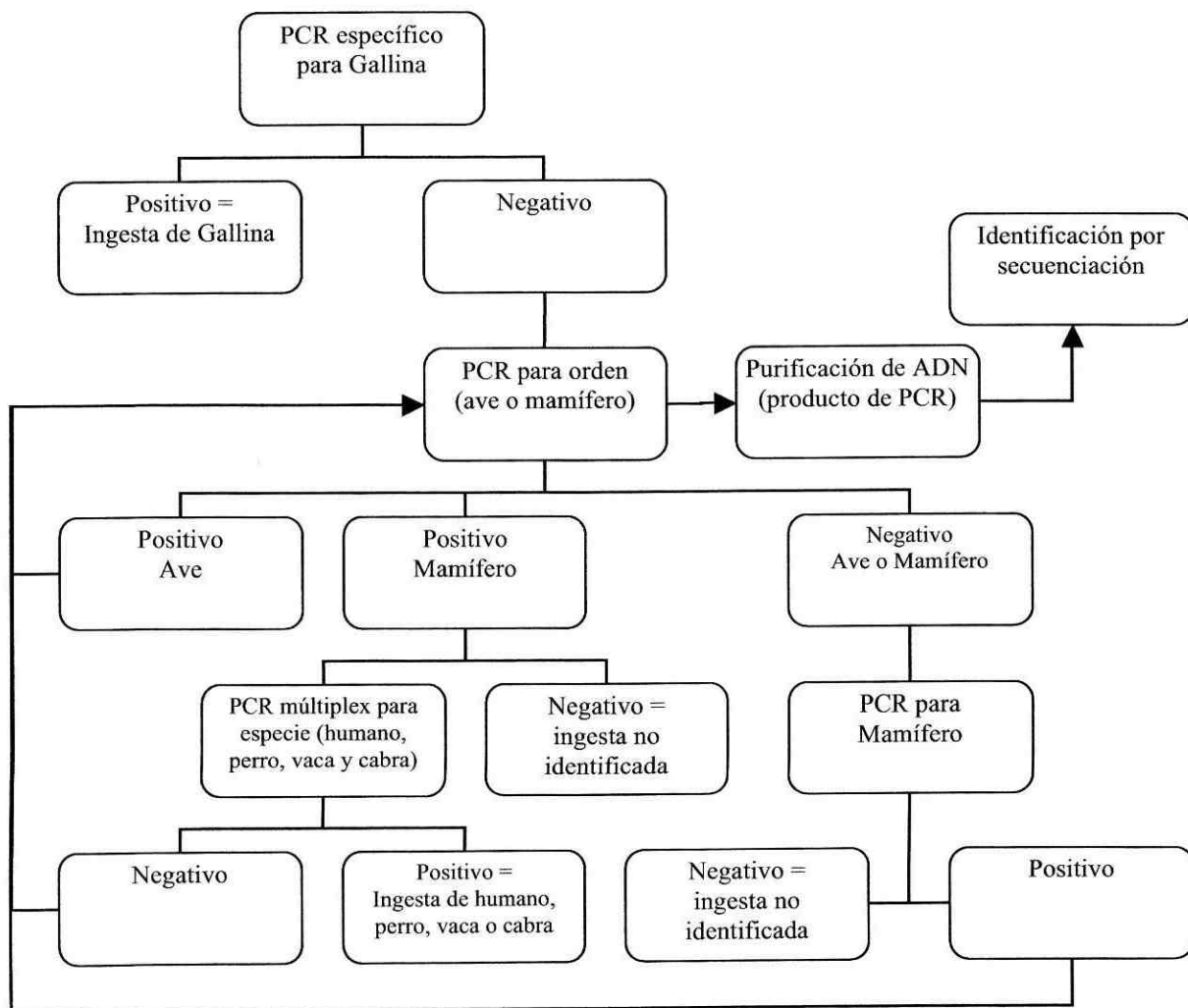
7.3	Sacar el gel, agitar suavemente y dejar enfriar (~50°C). Agregar 1.5µL de solución de bromuro de Etidio (o una gota con gotero).
7.4	Verter el gel en la plataforma y dejar polimerizar por al menos 25 min.
<b>Procedimiento electroforesis</b>	
7.5	Quitar los peines del gel, con cuidado de no romper los pozos.
7.6	Colocar el gel, con todo y bandeja, en la cámara de electroforesis, y cubrir con buffer TBE 1x hasta donde indica la cámara.
7.7	Cargar 5 a 10 µL de producto de PCR con 1 a 3 µL de Buffer de Carga a partir del segundo pozo. (Nota: Si se utilizó buffer 5X GoTaq verde no es necesario agregar buffer de carga, cargar directamente los 10 µL de producto de PCR en el gel)
7.8	Mezclar con la pipeta, sobre parafilm 30 µL de marcador molecular con 10 µL de buffer de carga y repartir en los 4 pozos extremos del gel.
7.9	Tapar la cámara y encender a 100V.
7.10	El tiempo de corrida depende del tamaño de los fragmentos esperados para cada tipo de PCR.
<b>Visualización de ADN:</b>	
7.11	Apagar la cámara de electroforesis.
7.12	Levantar el gel y escurrir todo el buffer, secar con kimwipe el exceso y colocarlo en el centro del transiluminador UV.
7.13	Cerrar la compuerta y encender la regleta. Ajustar el tiempo de captura para visualizar los productos de PCR.
7.14	Capturar la imagen con el programa Gabbit en la computadora y guardar una copia en la carpeta WNV
<b>Almacenamiento y manejo de muestras:</b>	

 <p style="text-align: center;"><b>Laboratorio de Enfermedades Arbovirales y Zoonóticas CES-UVG/CDC-CAP</b></p>	<b>POE #:</b>	WNV-IS008
	<b>Revisión #:</b>	14
	<b>Página:</b>	4 de 4
	<b>Fecha de implementación:</b>	13/06/2008
	<b>Revisado/Actualizado:</b>	19/09/2009
<b>Título:</b>	Electroforesis en gel de agarosa	<b>Aprobado por:</b> ME Morales-Betoulle, Investigador Principal
<b>Elaborado por:</b>	AS González-Reiche	

	7.15	Los productos de PCR se almacenan a 4°C hasta que se tienen los resultados de la electroforesis.
	<b>Limpieza y desinfección de materiales y área de trabajo:</b>	
	7.16	Los tubos o placas de PCR se descartan en la bolsa de desechos biopeligrosos que luego es incinerada por la empresa Ecotermo (Lab II2-302).
	7.17	Apagar el transiluminador, sacar el gel y descartarlo en el recipiente que contiene carbono activado. Limpiar el interior del transiluminador con un kimwipe y agua.
	7.18	Secar y limpiar bien con kimwipe la placa del gel, limpiar y despejar el área de trabajo y descartar kimwipes, cajas de puntas, y guantes en la bolsa para desechos contaminados con EtBr <sub>2</sub> .
<b>8</b>	<b>Manejo de registros:</b>	
	8.1	Pegar en el cuaderno de trabajo una copia del Gel e identificar las muestras en cada pozo.
<b>9</b>	<b>Responsables:</b>	
	<b>Personal</b> – Investigadores y estudiantes que realicen el procedimiento. Verificar que todo el material para realizar este POE esté completo. Esterilizar periódicamente tubos de 1.5 mL exclusivos para PCR en suficiente cantidad para realizar el procedimiento.	

## APENDICE II. Algoritmo de identificación de ingestas sanguíneas.

Figura 13. Algoritmo de identificación de las ingestas sanguíneas de *Cx. quiquefasciatus* alimentados colectados en Puerto Barrios durante 2007. Una porción del ADN extraído de los abdómenes macerados de los zancudos, fue sometida a diversas las reacciones de PCR para la identificación de los hospederos aviares y mamíferos.



APENDICE III. Resultados de PCR y secuenciación de ADN de ingesta sanguínea

Número de identificación (GU-2007) <sup>a</sup>	Género y especie	Fecha de colecta	Cuadrante <sup>b</sup>	Ingesta Sanguínea <sup>c</sup>	Comentarios <sup>d</sup>
-01041_01	<i>Culex quinquefasciatus</i>	08/02/2007	5	no ID	
-01041_02	<i>Culex quinquefasciatus</i>	08/02/2007	5	no ID	
-01069_01	<i>Culex quinquefasciatus</i>	08/02/2007	4	no ID	
-01069_02	<i>Culex quinquefasciatus</i>	08/02/2007	4	no ID	
-01078_01	<i>Culex quinquefasciatus</i>	08/02/2007	4	Otro	+ MAMAVI CJ, 508 pb. Banda tenue. Secuenciado Ago-08. NO SECUENCIA
-01078_02	<i>Culex quinquefasciatus</i>	08/02/2007	4	<i>Gallus gallus</i>	
-01078_03	<i>Culex quinquefasciatus</i>	08/02/2007	4	no ID	
-01078_04	<i>Culex quinquefasciatus</i>	08/02/2007	4	no ID	
-01078_05	<i>Culex quinquefasciatus</i>	08/02/2007	4	<i>Gallus gallus</i>	+ Blood
-01078_06	<i>Culex quinquefasciatus</i>	08/02/2007	4	no ID	
-01078_07	<i>Culex quinquefasciatus</i>	08/02/2007	4	<i>Gallus gallus</i>	+ Blood
-01078_08	<i>Culex quinquefasciatus</i>	08/02/2007	4	no ID	
-01078_09	<i>Culex quinquefasciatus</i>	08/02/2007	4	no ID	
-01129_01	<i>Culex quinquefasciatus</i>	08/02/2007	10	no ID	
-01134_01	<i>Culex quinquefasciatus</i>	08/02/2007	9	no ID	
-01141_01	<i>Culex quinquefasciatus</i>	08/02/2007	3	no ID	
-01203_01	<i>Culex quinquefasciatus</i>	23/03/2007	10	no ID	
-01203_02	<i>Culex quinquefasciatus</i>	23/03/2007	10	no ID	
-01203_03	<i>Culex quinquefasciatus</i>	23/03/2007	10	no ID	
-01208_01	<i>Culex quinquefasciatus</i>	23/03/2007	4	no ID	
-01208_02	<i>Culex quinquefasciatus</i>	23/03/2007	4	no ID	
-01214_01	<i>Culex quinquefasciatus</i>	23/03/2007	9	no ID	
-01214_02	<i>Culex quinquefasciatus</i>	23/03/2007	9	<i>Meleagris gallopavo</i>	+ MAMAVI CJ. Secuenciado Ago-08. %Identidad 100%.
-01404_01	<i>Culex quinquefasciatus</i>	22/04/2007	6		Procesado para ARN
-01404_02	<i>Culex quinquefasciatus</i>	22/04/2007	6		Procesado para ARN
-01404_03	<i>Culex quinquefasciatus</i>	22/04/2007	6		Procesado para ARN
-01404_04	<i>Culex quinquefasciatus</i>	22/04/2007	6		Procesado para ARN
-01404_05	<i>Culex quinquefasciatus</i>	22/04/2007	6		Procesado para ARN
-01404_06	<i>Culex quinquefasciatus</i>	22/04/2007	6		Procesado para ARN
-01404_07	<i>Culex quinquefasciatus</i>	22/04/2007	6		Procesado para ARN
-01404_08	<i>Culex quinquefasciatus</i>	22/04/2007	6		Procesado para ARN
-01404_09	<i>Culex quinquefasciatus</i>	22/04/2007	6		Procesado para ARN
-01404_10	<i>Culex quinquefasciatus</i>	22/04/2007	6		Procesado para ARN
-01404_11	<i>Culex quinquefasciatus</i>	22/04/2007	6		Procesado para ARN
-01404_12	<i>Culex quinquefasciatus</i>	22/04/2007	6		Procesado para ARN
-01404_13	<i>Culex quinquefasciatus</i>	22/04/2007	6		Procesado para ARN
-01404_14	<i>Culex quinquefasciatus</i>	22/04/2007	6		Procesado para ARN
-01404_15	<i>Culex quinquefasciatus</i>	22/04/2007	6		Procesado para ARN
-01404_16	<i>Culex quinquefasciatus</i>	22/04/2007	6		Procesado para ARN
-01404_17	<i>Culex quinquefasciatus</i>	22/04/2007	6		Procesado para ARN
-01404_18	<i>Culex quinquefasciatus</i>	22/04/2007	6		Procesado para ARN
-01404_19	<i>Culex quinquefasciatus</i>	22/04/2007	6		Procesado para ARN
-01404_20	<i>Culex quinquefasciatus</i>	22/04/2007	6		Procesado para ARN
-01404_21	<i>Culex quinquefasciatus</i>	22/04/2007	6		Procesado para ARN
-01404_22	<i>Culex quinquefasciatus</i>	22/04/2007	6		Procesado para ARN
-01404_23	<i>Culex quinquefasciatus</i>	22/04/2007	6		Procesado para ARN
-01404_24	<i>Culex quinquefasciatus</i>	22/04/2007	6		Procesado para ARN
-01404_25	<i>Culex quinquefasciatus</i>	22/04/2007	6		Procesado para ARN
-01404_26	<i>Culex quinquefasciatus</i>	22/04/2007	6		Procesado para ARN
-01404_27	<i>Culex quinquefasciatus</i>	22/04/2007	6		Procesado para ARN
-01404_28	<i>Culex quinquefasciatus</i>	22/04/2007	6		Procesado para ARN
-01404_29	<i>Culex quinquefasciatus</i>	22/04/2007	6		Procesado para ARN
-01404_30	<i>Culex quinquefasciatus</i>	22/04/2007	6		Procesado para ARN
-01404_31	<i>Culex quinquefasciatus</i>	22/04/2007	6		Procesado para ARN
-01404_32	<i>Culex quinquefasciatus</i>	22/04/2007	6		Procesado para ARN
-01404_33	<i>Culex quinquefasciatus</i>	22/04/2007	6		Procesado para ARN
-01404_34	<i>Culex quinquefasciatus</i>	22/04/2007	6		Procesado para ARN
-01404_35	<i>Culex quinquefasciatus</i>	22/04/2007	6		Procesado para ARN
-01404_36	<i>Culex quinquefasciatus</i>	22/04/2007	6		Procesado para ARN
-01423_01	<i>Culex quinquefasciatus</i>	20/04/2007	5		Procesado para ARN
-01423_02	<i>Culex quinquefasciatus</i>	20/04/2007	5		Procesado para ARN

Número de identificación (GU-2007) <sup>a</sup>	Género y especie	Fecha de colecta	Cuadrante <sup>b</sup>	Ingesta Sangínea <sup>c</sup>	Comentarios <sup>d</sup>
-01448_01	<i>Culex quinquefasciatus</i>	19/04/2007	3		Procesado para ARN
-01480_01	<i>Culex quinquefasciatus</i>	20/04/2007	4		Procesado para ARN
-01480_02	<i>Culex quinquefasciatus</i>	20/04/2007	4		Procesado para ARN
-01480_03	<i>Culex quinquefasciatus</i>	20/04/2007	4		Procesado para ARN
-01488_01	<i>Culex quinquefasciatus</i>	20/04/2007	4		Procesado para ARN
-01488_02	<i>Culex quinquefasciatus</i>	20/04/2007	4		Procesado para ARN
-01488_03	<i>Culex quinquefasciatus</i>	20/04/2007	4		Procesado para ARN
-01488_04	<i>Culex quinquefasciatus</i>	20/04/2007	4		Procesado para ARN
-01488_05	<i>Culex quinquefasciatus</i>	20/04/2007	4		Procesado para ARN
-01488_06	<i>Culex quinquefasciatus</i>	20/04/2007	4		Procesado para ARN
-01862_01	<i>Culex quinquefasciatus</i>	30/05/2007	5	<i>Gallus gallus</i>	+ Blood
-01868_01	<i>Culex quinquefasciatus</i>	30/05/2007	5	no ID	
-01868_02	<i>Culex quinquefasciatus</i>	30/05/2007	5	<i>Quiscalus mexicanus</i>	+ MAMAVI CJ. Secuenciado Ago-08. %Identidad/E-value 99/0.0
-01868_03	<i>Culex quinquefasciatus</i>	30/05/2007	5	no ID	
-01868_04	<i>Culex quinquefasciatus</i>	30/05/2007	5	no ID	
-01868_05	<i>Culex quinquefasciatus</i>	30/05/2007	5	<i>Gallus gallus</i>	+ Blood
-01868_06	<i>Culex quinquefasciatus</i>	30/05/2007	5	no ID	
-01868_07	<i>Culex quinquefasciatus</i>	30/05/2007	5	no ID	
-01868_08	<i>Culex quinquefasciatus</i>	30/05/2007	5	no ID	
-01868_09	<i>Culex quinquefasciatus</i>	30/05/2007	5	<i>Quiscalus mexicanus</i>	+ MAMAVI CJ. Secuenciado Ago-08. %Identidad/E-value 94/1e-58
-01868_10	<i>Culex quinquefasciatus</i>	30/05/2007	5	<i>Quiscalus mexicanus</i>	+ MAMAVI, Cicero & Jonson. Secuenciado Ago-08. %Identidad/E-value 99/0.0
-01868_11	<i>Culex quinquefasciatus</i>	30/05/2007	5	<i>Canis familiaris</i>	+ MAMAVI CJ. + Blood
-01868_12	<i>Culex quinquefasciatus</i>	30/05/2007	5	no ID	
-01868_13	<i>Culex quinquefasciatus</i>	30/05/2007	5	no ID	
-01873_01	<i>Culex quinquefasciatus</i>	31/05/2007	3	<i>Gallus gallus</i>	+ Blood
-01873_02	<i>Culex quinquefasciatus</i>	31/05/2007	3	no ID	
-01873_03	<i>Culex quinquefasciatus</i>	31/05/2007	3	<i>Canis familiaris</i>	+ MAMAVI CJ, + Blood
-01873_04	<i>Culex quinquefasciatus</i>	31/05/2007	3	no ID	
-01873_05	<i>Culex quinquefasciatus</i>	31/05/2007	3	no ID	
-01873_06	<i>Culex quinquefasciatus</i>	31/05/2007	3	no ID	
-01873_07	<i>Culex quinquefasciatus</i>	31/05/2007	3	<i>Canis familiaris</i>	+ MAMAVI CJ, + Blood
-01873_08	<i>Culex quinquefasciatus</i>	31/05/2007	3	no ID	
-01873_09	<i>Culex quinquefasciatus</i>	31/05/2007	3	no ID	
-01873_10	<i>Culex quinquefasciatus</i>	31/05/2007	3	no ID	
-01873_11	<i>Culex quinquefasciatus</i>	31/05/2007	3	no ID	
-01873_12	<i>Culex quinquefasciatus</i>	31/05/2007	3	no ID	
-01882_01	<i>Culex quinquefasciatus</i>	31/05/2007	3	no ID	
-01894_01	<i>Culex quinquefasciatus</i>	31/05/2007	6	<i>Gallus gallus</i>	+ Blood
-01894_02	<i>Culex quinquefasciatus</i>	31/05/2007	6	<i>Gallus gallus</i>	+ Blood
-01894_03	<i>Culex quinquefasciatus</i>	31/05/2007	6	no ID	
-01894_04	<i>Culex quinquefasciatus</i>	31/05/2007	6	no ID	
-01897_01	<i>Culex quinquefasciatus</i>	31/05/2007	6	<i>Gallus gallus</i>	+ Blood
-01897_02	<i>Culex quinquefasciatus</i>	31/05/2007	6	no ID	
-01897_03	<i>Culex quinquefasciatus</i>	31/05/2007	6	no ID	
-01897_04	<i>Culex quinquefasciatus</i>	31/05/2007	6	no ID	
-01897_05	<i>Culex quinquefasciatus</i>	31/05/2007	6	<i>Gallus gallus</i>	+ Blood
-01897_06	<i>Culex quinquefasciatus</i>	31/05/2007	6	no ID	
-01897_07	<i>Culex quinquefasciatus</i>	31/05/2007	6	no ID	
-01897_08	<i>Culex quinquefasciatus</i>	31/05/2007	6	no ID	
-01897_09	<i>Culex quinquefasciatus</i>	31/05/2007	6	Otro	+ MAMAVI CJ. Secuenciado Ago-08. NO SECUENCIA
-01897_10	<i>Culex quinquefasciatus</i>	31/05/2007	6	no ID	
-01897_11	<i>Culex quinquefasciatus</i>	31/05/2007	6	no ID	
-01897_12	<i>Culex quinquefasciatus</i>	31/05/2007	6	no ID	
-01897_13	<i>Culex quinquefasciatus</i>	31/05/2007	6	no ID	
-01897_14	<i>Culex quinquefasciatus</i>	31/05/2007	6	no ID	
-01897_15	<i>Culex quinquefasciatus</i>	31/05/2007	6	no ID	
-01897_16	<i>Culex quinquefasciatus</i>	31/05/2007	6	no ID	

Número de identificación (GU-2007) <sup>a</sup>	Género y especie	Fecha de colecta	Cuadrante <sup>b</sup>	Ingesta Sangínea <sup>c</sup>	Comentarios <sup>d</sup>
-01897_17	<i>Culex quinquefasciatus</i>	31/05/2007	6	no ID	
-01897_18	<i>Culex quinquefasciatus</i>	31/05/2007	6	no ID	
-01897_19	<i>Culex quinquefasciatus</i>	31/05/2007	6	no ID	
-01897_20	<i>Culex quinquefasciatus</i>	31/05/2007	6	no ID	
-01897_21	<i>Culex quinquefasciatus</i>	31/05/2007	6	no ID	
-01897_22	<i>Culex quinquefasciatus</i>	31/05/2007	6	no ID	
-01897_23	<i>Culex quinquefasciatus</i>	31/05/2007	6	no ID	
-01897_24	<i>Culex quinquefasciatus</i>	31/05/2007	6	<i>Gallus gallus</i>	+ Blood
-01897_25	<i>Culex quinquefasciatus</i>	31/05/2007	6	no ID	
-01897_26	<i>Culex quinquefasciatus</i>	31/05/2007	6	no ID	
-01897_27	<i>Culex quinquefasciatus</i>	31/05/2007	6	<i>Gallus gallus</i>	+ Blood
-01897_28	<i>Culex quinquefasciatus</i>	31/05/2007	6	<i>Gallus gallus</i>	
-01897_29	<i>Culex quinquefasciatus</i>	31/05/2007	6		Perdida en procesamiento (disección)
-01912_01	<i>Culex quinquefasciatus</i>	30/05/2007	9	<i>Gallus gallus</i>	+ Blood
-01912_02	<i>Culex quinquefasciatus</i>	30/05/2007	9	Otro	+ MAMAVI CJ. 290 pb. Secuenciado Ago-08. NO SIMILITUD SIGNIFICATIVA
-01912_03	<i>Culex quinquefasciatus</i>	30/05/2007	9	<i>Gallus gallus</i>	+ Blood
-01912_04	<i>Culex quinquefasciatus</i>	30/05/2007	9	Otro	+ MAMAVI CJ. 290 pb Banda tenue. Secuenciado Ago-08. NO SECUENCIA.
-01912_05	<i>Culex quinquefasciatus</i>	30/05/2007	9	no ID	
-01912_06	<i>Culex quinquefasciatus</i>	30/05/2007	9	no ID	
-01912_07	<i>Culex quinquefasciatus</i>	30/05/2007	9	<i>Gallus gallus</i>	+ Blood
-01912_08	<i>Culex quinquefasciatus</i>	30/05/2007	9	Otro	+ MAMAVI CJ.290 pb, Secuenciado Ago-08. NO SIMILITUD SIGNIFICATIVA
-01912_09	<i>Culex quinquefasciatus</i>	30/05/2007	9	no ID	
-01912_10	<i>Culex quinquefasciatus</i>	30/05/2007	9	no ID	
-01912_11	<i>Culex quinquefasciatus</i>	30/05/2007	9	no ID	
-01912_12	<i>Culex quinquefasciatus</i>	30/05/2007	9	<i>Gallus gallus</i>	+ Blood
-01912_13	<i>Culex quinquefasciatus</i>	30/05/2007	9	<i>Gallus gallus</i>	+ Blood
-01912_14	<i>Culex quinquefasciatus</i>	30/05/2007	9	<i>Gallus gallus</i>	+ Blood
-01912_15	<i>Culex quinquefasciatus</i>	30/05/2007	9	<i>Gallus gallus</i>	+ Blood
-01912_16	<i>Culex quinquefasciatus</i>	30/05/2007	9	<i>Gallus gallus</i>	+ Blood
-01912_17	<i>Culex quinquefasciatus</i>	30/05/2007	9	<i>Meleagris gallopavo</i>	+ MAMAVI CJ. Secuenciado Ago-08. %Identity/E-value 100/0.0
-01912_18	<i>Culex quinquefasciatus</i>	30/05/2007	9	<i>Gallus gallus</i>	+ Blood
-01912_19	<i>Culex quinquefasciatus</i>	30/05/2007	9	no ID	
-01912_20	<i>Culex quinquefasciatus</i>	30/05/2007	9	<i>Gallus gallus</i>	+ Blood
-01912_21	<i>Culex quinquefasciatus</i>	30/05/2007	9	<i>Gallus gallus</i>	+ Blood
-01912_22	<i>Culex quinquefasciatus</i>	30/05/2007	9	<i>Canis familiaris</i>	+ MAMAVI CJ, + Blood
-01912_23	<i>Culex quinquefasciatus</i>	30/05/2007	9	no ID	
-01912_24	<i>Culex quinquefasciatus</i>	30/05/2007	9	<i>Gallus gallus</i>	+ Blood
-01912_25	<i>Culex quinquefasciatus</i>	30/05/2007	9	<i>Gallus gallus</i>	+ Blood
-01912_26	<i>Culex quinquefasciatus</i>	30/05/2007	9	Otro	+ MAMAVI CJ. 508 pb. Secuenciado Ago-08. NO SIMILITUD SIGNIFICATIVA
-01912_27	<i>Culex quinquefasciatus</i>	30/05/2007	9	no ID	
-01912_28	<i>Culex quinquefasciatus</i>	30/05/2007	9	no ID	
-01912_29	<i>Culex quinquefasciatus</i>	30/05/2007	9	<i>Gallus gallus</i>	+ Blood
-01912_30	<i>Culex quinquefasciatus</i>	30/05/2007	9	<i>Gallus gallus</i>	+ Blood
-01912_31	<i>Culex quinquefasciatus</i>	30/05/2007	9	<i>Gallus gallus</i>	+ Blood
-01912_32	<i>Culex quinquefasciatus</i>	30/05/2007	9	no ID	
-01912_33	<i>Culex quinquefasciatus</i>	30/05/2007	9	<i>Gallus gallus</i>	+ Blood
-01912_34	<i>Culex quinquefasciatus</i>	30/05/2007	9	<i>Gallus gallus</i>	+ Blood
-01912_35	<i>Culex quinquefasciatus</i>	30/05/2007	9	no ID	
-01912_36	<i>Culex quinquefasciatus</i>	30/05/2007	9	no ID	
-01912_37	<i>Culex quinquefasciatus</i>	30/05/2007	9	<i>Gallus gallus</i>	+ Blood
-01923_01	<i>Culex quinquefasciatus</i>	30/05/2007	9	no ID	
-01923_02	<i>Culex quinquefasciatus</i>	30/05/2007	9	<i>Gallus gallus</i>	+ Blood. Banda tenue
-01923_03	<i>Culex quinquefasciatus</i>	30/05/2007	9	no ID	

Número de identificación (GU-2007) <sup>a</sup>	Género y especie	Fecha de colecta	Cuadrante <sup>b</sup>	Ingesta Sangínea <sup>c</sup>	Comentarios <sup>d</sup>
-01923_04	<i>Culex quinquefasciatus</i>	30/05/2007	9	<i>Meleagris gallopavo</i>	+ MAMAVI CJ. Secuenciado Ago-08. %Identity/E-value 100/0.0
-01923_05	<i>Culex quinquefasciatus</i>	30/05/2007	9	<i>Gallus gallus</i>	+ Blood
-01923_06	<i>Culex quinquefasciatus</i>	30/05/2007	9	<i>Gallus gallus</i>	+ Blood
-01923_07	<i>Culex quinquefasciatus</i>	30/05/2007	9	<i>Gallus gallus</i>	+ Blood
-01923_08	<i>Culex quinquefasciatus</i>	30/05/2007	9	no ID	
-01923_09	<i>Culex quinquefasciatus</i>	30/05/2007	9	no ID	
-01923_10	<i>Culex quinquefasciatus</i>	30/05/2007	9	no ID	
-01923_11	<i>Culex quinquefasciatus</i>	30/05/2007	9	<i>Gallus gallus</i>	+ Blood. banda tenue
-01923_12	<i>Culex quinquefasciatus</i>	30/05/2007	9	no ID	
-01923_13	<i>Culex quinquefasciatus</i>	30/05/2007	9	no ID	
-01923_14	<i>Culex quinquefasciatus</i>	30/05/2007	9	<i>Gallus gallus</i>	+ Blood
-01923_15	<i>Culex quinquefasciatus</i>	30/05/2007	9	<i>Gallus gallus</i>	+ Blood
-01923_16	<i>Culex quinquefasciatus</i>	30/05/2007	9	<i>Meleagris gallopavo</i>	+ MAMAVI CJ. Secuenciado Ago-08. %Identity/E-value 100/0.0
-01923_17	<i>Culex quinquefasciatus</i>	30/05/2007	9	no ID	
-01923_18	<i>Culex quinquefasciatus</i>	30/05/2007	9		Perdida en procesamiento
-01928_01	<i>Culex quinquefasciatus</i>	30/05/2007	4	no ID	
-01928_02	<i>Culex quinquefasciatus</i>	30/05/2007	4	no ID	
-01928_03	<i>Culex quinquefasciatus</i>	30/05/2007	4	no ID	
-01928_04	<i>Culex quinquefasciatus</i>	30/05/2007	4	<i>Gallus gallus</i>	+ Blood
-01928_05	<i>Culex quinquefasciatus</i>	30/05/2007	4	no ID	
-01928_06	<i>Culex quinquefasciatus</i>	30/05/2007	4	<i>Gallus gallus</i>	+ Blood
-01928_07	<i>Culex quinquefasciatus</i>	30/05/2007	4	no ID	
-01928_08	<i>Culex quinquefasciatus</i>	30/05/2007	4	<i>Gallus gallus</i>	+ Blood
-01928_09	<i>Culex quinquefasciatus</i>	30/05/2007	4	no ID	
-01928_10	<i>Culex quinquefasciatus</i>	30/05/2007	4	no ID	
-01928_11	<i>Culex quinquefasciatus</i>	30/05/2007	4	<i>Gallus gallus</i>	+ Blood
-01928_12	<i>Culex quinquefasciatus</i>	30/05/2007	4	no ID	
-01928_13	<i>Culex quinquefasciatus</i>	30/05/2007	4	<i>Gallus gallus</i>	+ Blood
-01928_14	<i>Culex quinquefasciatus</i>	30/05/2007	4	no ID	
-01947_01	<i>Culex quinquefasciatus</i>	30/05/2007	4	no ID	
-01947_02	<i>Culex quinquefasciatus</i>	30/05/2007	4	no ID	
-01947_03	<i>Culex quinquefasciatus</i>	30/05/2007	4	no ID	
-01947_04	<i>Culex quinquefasciatus</i>	30/05/2007	4	<i>Gallus gallus</i>	+ Blood
-01947_05	<i>Culex quinquefasciatus</i>	30/05/2007	4	<i>Gallus gallus</i>	+ Blood. banda tenue
-01947_06	<i>Culex quinquefasciatus</i>	30/05/2007	4	no ID	
-01947_07	<i>Culex quinquefasciatus</i>	30/05/2007	4	no ID	
-01947_08	<i>Culex quinquefasciatus</i>	30/05/2007	4	no ID	
-01947_09	<i>Culex quinquefasciatus</i>	30/05/2007	4	no ID	
-01947_10	<i>Culex quinquefasciatus</i>	30/05/2007	4	no ID	
-01947_11	<i>Culex quinquefasciatus</i>	30/05/2007	4	no ID	
-01947_12	<i>Culex quinquefasciatus</i>	30/05/2007	4	no ID	
-01947_13	<i>Culex quinquefasciatus</i>	30/05/2007	4	no ID	
-01947_14	<i>Culex quinquefasciatus</i>	30/05/2007	4	<i>Gallus gallus</i>	+ Blood
-01947_15	<i>Culex quinquefasciatus</i>	30/05/2007	4	no ID	
-01947_16	<i>Culex quinquefasciatus</i>	30/05/2007	4	<i>Rattus norvegicus</i>	+ MAMAVI CJ. Secuenciado Ago-08. %Identity/E-value 100/0.0
-01947_17	<i>Culex quinquefasciatus</i>	30/05/2007	4	no ID	
-01947_18	<i>Culex quinquefasciatus</i>	30/05/2007	4	<i>Gallus gallus</i>	+ Blood
-01947_19	<i>Culex quinquefasciatus</i>	30/05/2007	4	<i>Gallus gallus</i>	+ Blood
-01947_20	<i>Culex quinquefasciatus</i>	30/05/2007	4	no ID	
-01947_21	<i>Culex quinquefasciatus</i>	30/05/2007	4	no ID	
-02082_01	<i>Culex quinquefasciatus</i>	30/06/2007	6	no ID	
-02087_01	<i>Culex quinquefasciatus</i>	30/06/2007	10	<i>Gallus gallus</i>	+ Blood
-02087_02	<i>Culex quinquefasciatus</i>	30/06/2007	10	<i>Turdus grayi</i>	+ MAMAVI CJ. Secuenciado Ago-08. %Identity/E-value 100/0.0
-02087_03	<i>Culex quinquefasciatus</i>	30/06/2007	10	no ID	
-02087_04	<i>Culex quinquefasciatus</i>	30/06/2007	10	no ID	
-02087_05	<i>Culex quinquefasciatus</i>	30/06/2007	10	no ID	
-02087_06	<i>Culex quinquefasciatus</i>	30/06/2007	10	<i>Meleagris gallopavo</i>	+ MAMAVI CJ. Secuenciado Ago-08. %Identity/E-value 100/0.0

Número de identificación (GU-2007) <sup>a</sup>	Género y especie	Fecha de colecta	Cuadrante <sup>b</sup>	Ingesta Sangínea <sup>c</sup>	Comentarios <sup>d</sup>
-02108_01	<i>Culex quinquefasciatus</i>	30/06/2007	9	<i>Cairina moschata</i>	+ MAMAVI CJ. Secuenciado Ago-08. %Identity/E-value 99/0.0
-02108_02	<i>Culex quinquefasciatus</i>	30/06/2007	9	<i>Gallus gallus</i>	+ Blood
-02108_03	<i>Culex quinquefasciatus</i>	30/06/2007	9	<i>Gallus gallus</i>	+ Blood
-02108_04	<i>Culex quinquefasciatus</i>	30/06/2007	9	Otro	+MAMAVI CJ. 508 pb. Banda tenue. Secuenciado Ago-08. NO SECUENCIA
-02114_01	<i>Culex quinquefasciatus</i>	30/06/2007	9	<i>Meleagris gallopavo</i>	+ MAMAVI CJ. Secuenciado Ago-08. %Identity/E-value 100/0.0
-02114_02	<i>Culex quinquefasciatus</i>	30/06/2007	9	no ID	
-02114_03	<i>Culex quinquefasciatus</i>	30/06/2007	9	<i>Gallus gallus</i>	+ Blood
-02114_04	<i>Culex quinquefasciatus</i>	30/06/2007	9	<i>Gallus gallus</i>	+ Blood
-02114_05	<i>Culex quinquefasciatus</i>	30/06/2007	9	<i>Gallus gallus</i>	+ Blood
-02114_06	<i>Culex quinquefasciatus</i>	30/06/2007	9	no ID	
-02114_07	<i>Culex quinquefasciatus</i>	30/06/2007	9	no ID	
-02114_08	<i>Culex quinquefasciatus</i>	30/06/2007	9	no ID	
-02114_09	<i>Culex quinquefasciatus</i>	30/06/2007	9	<i>Gallus gallus</i>	+ Blood
-02114_10	<i>Culex quinquefasciatus</i>	30/06/2007	9	no ID	
-02114_11	<i>Culex quinquefasciatus</i>	30/06/2007	9	<i>Meleagris gallopavo</i>	+ MAMAVI CJ. Secuenciado Ago-08. %Identity/E-value 100/0.0
-02114_12	<i>Culex quinquefasciatus</i>	30/06/2007	9	<i>Gallus gallus</i>	+ Blood
-02114_13	<i>Culex quinquefasciatus</i>	30/06/2007	9	no ID	
-02114_14	<i>Culex quinquefasciatus</i>	30/06/2007	9	<i>Gallus gallus</i>	+ Blood
-02114_15	<i>Culex quinquefasciatus</i>	30/06/2007	9	no ID	
-02114_16	<i>Culex quinquefasciatus</i>	30/06/2007	9	no ID	
-02114_17	<i>Culex quinquefasciatus</i>	30/06/2007	9	<i>Gallus gallus</i>	+ Blood
-02114_18	<i>Culex quinquefasciatus</i>	30/06/2007	9	<i>Gallus gallus</i>	+ Blood
-02114_19	<i>Culex quinquefasciatus</i>	30/06/2007	9	<i>Gallus gallus</i>	+ Blood
-02114_20	<i>Culex quinquefasciatus</i>	30/06/2007	9	<i>Gallus gallus</i>	+ Blood
-02114_21	<i>Culex quinquefasciatus</i>	30/06/2007	9	no ID	
-02114_22	<i>Culex quinquefasciatus</i>	30/06/2007	9	no ID	
-02114_23	<i>Culex quinquefasciatus</i>	30/06/2007	9	no ID	
-02114_24	<i>Culex quinquefasciatus</i>	30/06/2007	9	no ID	
-02114_25	<i>Culex quinquefasciatus</i>	30/06/2007	9	<i>Gallus gallus</i>	+ Blood
-02114_26	<i>Culex quinquefasciatus</i>	30/06/2007	9	<i>Gallus gallus</i>	+ Blood
-02114_27	<i>Culex quinquefasciatus</i>	30/06/2007	9	no ID	
-02114_28	<i>Culex quinquefasciatus</i>	30/06/2007	9	no ID	
-02114_29	<i>Culex quinquefasciatus</i>	30/06/2007	9	<i>Gallus gallus</i>	+ Blood
-02114_30	<i>Culex quinquefasciatus</i>	30/06/2007	9	<i>Cairina moschata</i>	+ MAMAVI CJ. Secuenciado Ago-08. %Identity/E-value 99/0.0
-02114_31	<i>Culex quinquefasciatus</i>	30/06/2007	9	no ID	
-02114_32	<i>Culex quinquefasciatus</i>	30/06/2007	9	<i>Gallus gallus</i>	+ Blood
-02114_33	<i>Culex quinquefasciatus</i>	30/06/2007	9	<i>Gallus gallus</i>	+ Blood
-02114_34	<i>Culex quinquefasciatus</i>	30/06/2007	9	<i>Gallus gallus</i>	+ Blood
-02114_35	<i>Culex quinquefasciatus</i>	30/06/2007	9	<i>Cairina moschata</i>	+ MAMAVI CJ. Secuenciado Ago-08. %Identity/E-value 99/0.0
-02114_36	<i>Culex quinquefasciatus</i>	30/06/2007	9	no ID	
-02114_37	<i>Culex quinquefasciatus</i>	30/06/2007	9	<i>Cairina moschata</i>	+ MAMAVI CJ. Secuenciado Ago-08. %Identity/E-value 99/0.0
-02114_38	<i>Culex quinquefasciatus</i>	30/06/2007	9	<i>Cairina moschata</i>	+ MAMAVI CJ. Secuenciado Ago-08. 99/0.0
-02114_39	<i>Culex quinquefasciatus</i>	30/06/2007	9	<i>Gallus gallus</i>	+ Blood
-02114_40	<i>Culex quinquefasciatus</i>	30/06/2007	9	<i>Gallus gallus</i>	+ Blood
-02114_41	<i>Culex quinquefasciatus</i>	30/06/2007	9	no ID	
-02114_42	<i>Culex quinquefasciatus</i>	30/06/2007	9	<i>Gallus gallus</i>	+ Blood
-02114_43	<i>Culex quinquefasciatus</i>	30/06/2007	9	no ID	
-02114_44	<i>Culex quinquefasciatus</i>	30/06/2007	9	no ID	
-02114_45	<i>Culex quinquefasciatus</i>	30/06/2007	9	<i>Meleagris gallopavo</i>	+ MAMAVI CJ. Secuenciado Ago-08. %Identity/E-value 100/0.0
-02114_46	<i>Culex quinquefasciatus</i>	30/06/2007	9	no ID	

Número de identificación (GU-2007) <sup>a</sup>	Género y especie	Fecha de colecta	Cuadrante <sup>b</sup>	Ingesta Sangínea <sup>c</sup>	Comentarios <sup>d</sup>
-02114_47	<i>Culex quinquefasciatus</i>	30/06/2007	9	no ID	
-02114_48	<i>Culex quinquefasciatus</i>	30/06/2007	9	no ID	
-02114_49	<i>Culex quinquefasciatus</i>	30/06/2007	9	no ID	
-02114_50	<i>Culex quinquefasciatus</i>	30/06/2007	9	<i>Gallus gallus</i>	+ Blood
-02115_01	<i>Culex quinquefasciatus</i>	30/06/2007	9	<i>Cairina moschata</i>	+ MAMAVI CJ. Secuenciado Ago-08. %Identity/E-value 99/0.0
-02115_02	<i>Culex quinquefasciatus</i>	30/06/2007	9	<i>Cairina moschata</i>	+ MAMAVI CJ. Secuenciado Ago-08. %Identity/E-value 99/0.0
-02115_03	<i>Culex quinquefasciatus</i>	30/06/2007	9	<i>Gallus gallus</i>	+ Blood
-02115_04	<i>Culex quinquefasciatus</i>	30/06/2007	9	<i>Gallus gallus</i>	+ Blood
-02115_05	<i>Culex quinquefasciatus</i>	30/06/2007	9	<i>Gallus gallus</i>	+ Blood
-02115_06	<i>Culex quinquefasciatus</i>	30/06/2007	9	no ID	
-02115_07	<i>Culex quinquefasciatus</i>	30/06/2007	9	<i>Gallus gallus</i>	+ Blood
-02115_08	<i>Culex quinquefasciatus</i>	30/06/2007	9	Otro	+ MAMAVI CJ, 290 pb. Secuenciado Ago-08. NO SIMILITUD SIGNIFICATIVA.
-02115_09	<i>Culex quinquefasciatus</i>	30/06/2007	9	<i>Gallus gallus</i>	+ Blood
-02115_10	<i>Culex quinquefasciatus</i>	30/06/2007	9	no ID	
-02115_11	<i>Culex quinquefasciatus</i>	30/06/2007	9	no ID	
-02115_12	<i>Culex quinquefasciatus</i>	30/06/2007	9	no ID	
-02115_13	<i>Culex quinquefasciatus</i>	30/06/2007	9	no ID	
-02115_14	<i>Culex quinquefasciatus</i>	30/06/2007	9	<i>Canis familiaris</i>	+ MAMAVI, CJ, +Blood
-02115_15	<i>Culex quinquefasciatus</i>	30/06/2007	9	Otro	+ MAMAVI CJ. 290 pb. Secuenciado Ago-08. NO SIMILITUD SIGNIFICATIVA
-02131_01	<i>Culex quinquefasciatus</i>	30/06/2007	3	no ID	
-02131_02	<i>Culex quinquefasciatus</i>	30/06/2007	3	no ID	
-02151_01	<i>Culex quinquefasciatus</i>	30/06/2007	5	<i>Gallus gallus</i>	+ Blood
-02151_02	<i>Culex quinquefasciatus</i>	30/06/2007	5	<i>Canis familiaris</i>	+ MAMAVI CJ. + Blood
-02151_03	<i>Culex quinquefasciatus</i>	30/06/2007	5	no ID	
-02151_04	<i>Culex quinquefasciatus</i>	30/06/2007	5	<i>Gallus gallus</i>	+ Blood
-02157_01	<i>Culex quinquefasciatus</i>	30/06/2007	4	<i>Gallus gallus</i>	+ Blood
-02157_02	<i>Culex quinquefasciatus</i>	30/06/2007	4	no ID	
-02157_03	<i>Culex quinquefasciatus</i>	30/06/2007	4		
-02157_04	<i>Culex quinquefasciatus</i>	30/06/2007	4		
-02167_01	<i>Culex quinquefasciatus</i>	30/06/2007	4	<i>Gallus gallus</i>	+ Blood
-02167_02	<i>Culex quinquefasciatus</i>	30/06/2007	4	no ID	
-02180_01	<i>Culex quinquefasciatus</i>	06/07/2007	6	<i>Gallus gallus</i>	+ Blood
-02180_02	<i>Culex quinquefasciatus</i>	06/07/2007	6	no ID	
-02180_03	<i>Culex quinquefasciatus</i>	06/07/2007	6	no ID	
-02180_04	<i>Culex quinquefasciatus</i>	06/07/2007	6	no ID	
-02180_05	<i>Culex quinquefasciatus</i>	06/07/2007	6	<i>Gallus gallus</i>	+ Blood
-02180_06	<i>Culex quinquefasciatus</i>	06/07/2007	6	no ID	
-02180_07	<i>Culex quinquefasciatus</i>	06/07/2007	6	no ID	
-02180_08	<i>Culex quinquefasciatus</i>	06/07/2007	6	<i>Gallus gallus</i>	+ Blood
-02180_09	<i>Culex quinquefasciatus</i>	06/07/2007	6	no ID	
-02180_10	<i>Culex quinquefasciatus</i>	06/07/2007	6	no ID	
-02180_11	<i>Culex quinquefasciatus</i>	06/07/2007	6	<i>Gallus gallus</i>	+ Blood
-02180_12	<i>Culex quinquefasciatus</i>	06/07/2007	6	no ID	
-02180_13	<i>Culex quinquefasciatus</i>	06/07/2007	6	<i>Gallus gallus</i>	+ Blood
-02180_14	<i>Culex quinquefasciatus</i>	06/07/2007	6	<i>Gallus gallus</i>	+ Blood
-02180_15	<i>Culex quinquefasciatus</i>	06/07/2007	6	<i>Gallus gallus</i>	+ Blood
-02180_16	<i>Culex quinquefasciatus</i>	06/07/2007	6	no ID	
-02180_17	<i>Culex quinquefasciatus</i>	06/07/2007	6	<i>Gallus gallus</i>	+ Blood
-02180_18	<i>Culex quinquefasciatus</i>	06/07/2007	6	<i>Gallus gallus</i>	+ Blood
-02180_19	<i>Culex quinquefasciatus</i>	06/07/2007	6	no ID	
-02180_20	<i>Culex quinquefasciatus</i>	06/07/2007	6	no ID	
-02180_21	<i>Culex quinquefasciatus</i>	06/07/2007	6	<i>Gallus gallus</i>	+ Blood
-02180_22	<i>Culex quinquefasciatus</i>	06/07/2007	6	no ID	
-02180_23	<i>Culex quinquefasciatus</i>	06/07/2007	6	<i>Gallus gallus</i>	+ Blood
-02209_01	<i>Culex quinquefasciatus</i>	06/07/2007	6	no ID	
-02209_02	<i>Culex quinquefasciatus</i>	06/07/2007	6	no ID	
-02209_03	<i>Culex quinquefasciatus</i>	06/07/2007	6	no ID	

Número de identificación (GU-2007) <sup>a</sup>	Género y especie	Fecha de colecta	Cuadrante <sup>b</sup>	Ingesta Sangínea <sup>c</sup>	Comentarios <sup>d</sup>
-02209_04	<i>Culex quinquefasciatus</i>	06/07/2007	6	no ID	
-02209_05	<i>Culex quinquefasciatus</i>	06/07/2007	6	no ID	
-02209_06	<i>Culex quinquefasciatus</i>	06/07/2007	6	<i>Gallus gallus</i>	+ Blood
-02209_07	<i>Culex quinquefasciatus</i>	06/07/2007	6		
-02209_08	<i>Culex quinquefasciatus</i>	06/07/2007	6		
-02346_01	<i>Culex quinquefasciatus</i>	01/08/2007	6	<i>Gallus gallus</i>	+ Blood
-02346_02	<i>Culex quinquefasciatus</i>	01/08/2007	6	<i>Gallus gallus</i>	+ Blood
-02346_03	<i>Culex quinquefasciatus</i>	01/08/2007	6	no ID	
-02346_04	<i>Culex quinquefasciatus</i>	01/08/2007	6	<i>Gallus gallus</i>	+ Blood
-02346_05	<i>Culex quinquefasciatus</i>	01/08/2007	6	no ID	
-02346_06	<i>Culex quinquefasciatus</i>	01/08/2007	6	no ID	
-02346_07	<i>Culex quinquefasciatus</i>	01/08/2007	6	<i>Gallus gallus</i>	+ Blood
-02346_08	<i>Culex quinquefasciatus</i>	01/08/2007	6	no ID	
-02346_09	<i>Culex quinquefasciatus</i>	01/08/2007	6	no ID	
-02346_10	<i>Culex quinquefasciatus</i>	01/08/2007	6	no ID	
-02346_11	<i>Culex quinquefasciatus</i>	01/08/2007	6	<i>Gallus gallus</i>	+ Blood
-02346_12	<i>Culex quinquefasciatus</i>	01/08/2007	6	<i>Canis familiaris</i>	+ MAMAVI CJ. + Blood
-02346_13	<i>Culex quinquefasciatus</i>	01/08/2007	6	<i>Gallus gallus</i>	+ Blood. Banda tenue
-02346_14	<i>Culex quinquefasciatus</i>	01/08/2007	6	<i>Gallus gallus</i>	+ Blood
-02346_15	<i>Culex quinquefasciatus</i>	01/08/2007	6	<i>Gallus gallus</i>	+ Blood
-02346_16	<i>Culex quinquefasciatus</i>	01/08/2007	6	no ID	
-02346_17	<i>Culex quinquefasciatus</i>	01/08/2007	6	<i>Canis familiaris</i>	+ MAMAVI CJ. + Blood
-02346_18	<i>Culex quinquefasciatus</i>	01/08/2007	6	no ID	
-02346_19	<i>Culex quinquefasciatus</i>	01/08/2007	6	no ID	
-02346_20	<i>Culex quinquefasciatus</i>	01/08/2007	6	no ID	
-02361_01	<i>Culex quinquefasciatus</i>	03/08/2007	5	<i>Gallus gallus</i>	+ Blood
-02380_01	<i>Culex quinquefasciatus</i>	02/08/2007	10	no ID	
-02390_01	<i>Culex quinquefasciatus</i>	02/08/2007	9	<i>Gallus gallus</i>	+ Blood
-02390_02	<i>Culex quinquefasciatus</i>	02/08/2007	9	Otro	+ MAMAVI CJ. 508 pb
-02390_03	<i>Culex quinquefasciatus</i>	02/08/2007	9	<i>Gallus gallus</i>	+ Blood
-02390_04	<i>Culex quinquefasciatus</i>	02/08/2007	9	<i>Gallus gallus</i>	+ Blood
-02390_05	<i>Culex quinquefasciatus</i>	02/08/2007	9	<i>Gallus gallus</i>	+ Blood
-02390_06	<i>Culex quinquefasciatus</i>	02/08/2007	9	<i>Gallus gallus</i>	+ Blood
-02390_07	<i>Culex quinquefasciatus</i>	02/08/2007	9	No ID	
-02390_08	<i>Culex quinquefasciatus</i>	02/08/2007	9	<i>Gallus gallus</i>	+ Blood
-02422_01	<i>Culex quinquefasciatus</i>	02/08/2007	4	<i>Gallus gallus</i>	+ Blood
-02422_02	<i>Culex quinquefasciatus</i>	02/08/2007	4	no ID	
-02422_03	<i>Culex quinquefasciatus</i>	02/08/2007	4	no ID	
-02422_04	<i>Culex quinquefasciatus</i>	02/08/2007	4	no ID	
-02422_05	<i>Culex quinquefasciatus</i>	02/08/2007	4	<i>Gallus gallus</i>	+ Blood
-02517_01	<i>Culex quinquefasciatus</i>	03/08/2007	3	no ID	
-02517_02	<i>Culex quinquefasciatus</i>	03/08/2007	3	no ID	
-02538_01	<i>Culex quinquefasciatus</i>	01/08/2007	6	<i>Gallus gallus</i>	+ Blood
-02538_02	<i>Culex quinquefasciatus</i>	01/08/2007	6	<i>Gallus gallus</i>	+ Blood
-02538_03	<i>Culex quinquefasciatus</i>	01/08/2007	6	no ID	
-02538_04	<i>Culex quinquefasciatus</i>	01/08/2007	6	no ID	
-02538_05	<i>Culex quinquefasciatus</i>	01/08/2007	6	<i>Gallus gallus</i>	+ Blood
-02538_06	<i>Culex quinquefasciatus</i>	01/08/2007	6	<i>Gallus gallus</i>	+ Blood
-02538_07	<i>Culex quinquefasciatus</i>	01/08/2007	6	no ID	
-02538_08	<i>Culex quinquefasciatus</i>	01/08/2007	6	no ID	
-02538_09	<i>Culex quinquefasciatus</i>	01/08/2007	6	<i>Canis familiaris</i>	+ MAMAVI, CJ. + Blood
-02538_10	<i>Culex quinquefasciatus</i>	01/08/2007	6	<i>Canis familiaris</i>	+ MAMAVI, CJ. + Blood
-02538_11	<i>Culex quinquefasciatus</i>	01/08/2007	6	no ID	
-02538_12	<i>Culex quinquefasciatus</i>	01/08/2007	6	<i>Canis familiaris</i>	+ MAMAVI, Mam. + Blood
-02538_13	<i>Culex quinquefasciatus</i>	01/08/2007	6	no ID	
-02538_14	<i>Culex quinquefasciatus</i>	01/08/2007	6	no ID	
-02538_15	<i>Culex quinquefasciatus</i>	01/08/2007	6	<i>Canis familiaris</i>	+ MAMAVI CJ. + Blood
-02538_16	<i>Culex quinquefasciatus</i>	01/08/2007	6	<i>Gallus gallus</i>	+ Blood
-02538_17	<i>Culex quinquefasciatus</i>	01/08/2007	6	<i>Gallus gallus</i>	+ Blood
-02538_18	<i>Culex quinquefasciatus</i>	01/08/2007	6	no ID	
-02538_19	<i>Culex quinquefasciatus</i>	01/08/2007	6	no ID	
-02538_20	<i>Culex quinquefasciatus</i>	01/08/2007	6	<i>Gallus gallus</i>	+ Blood
-02538_21	<i>Culex quinquefasciatus</i>	01/08/2007	6	<i>Gallus gallus</i>	+ Blood
-02584_01	<i>Culex quinquefasciatus</i>	01/08/2007	10	<i>Gallus gallus</i>	+ Blood
-02584_02	<i>Culex quinquefasciatus</i>	01/08/2007	10	no ID	
-02584_03	<i>Culex quinquefasciatus</i>	01/08/2007	10	<i>Gallus gallus</i>	+ Blood

Número de identificación (GU-2007) <sup>a</sup>	Género y especie	Fecha de colecta	Cuadrante <sup>b</sup>	Ingesta Sangínea <sup>c</sup>	Comentarios <sup>d</sup>
-02584_04	<i>Culex quinquefasciatus</i>	01/08/2007	10	no ID	
-02584_05	<i>Culex quinquefasciatus</i>	01/08/2007	10	<i>Gallus gallus</i>	+ Blood
-02584_06	<i>Culex quinquefasciatus</i>	01/08/2007	10	<i>Gallus gallus</i>	+ Blood
-02584_07	<i>Culex quinquefasciatus</i>	01/08/2007	10	no ID	
-02603_01	<i>Culex quinquefasciatus</i>	01/08/2007	10	no ID	
-02611_01	<i>Culex quinquefasciatus</i>	02/08/2007	9	no ID	
-02611_02	<i>Culex quinquefasciatus</i>	02/08/2007	9	<i>Gallus gallus</i>	+ Blood
-02614_01	<i>Culex quinquefasciatus</i>	02/08/2007	9		No procesado
-02614_02	<i>Culex quinquefasciatus</i>	02/08/2007	9		No procesado
-02614_03	<i>Culex quinquefasciatus</i>	02/08/2007	9		No procesado
-02614_04	<i>Culex quinquefasciatus</i>	02/08/2007	9		No procesado
-02614_05	<i>Culex quinquefasciatus</i>	02/08/2007	9		No procesado
-02614_06	<i>Culex quinquefasciatus</i>	02/08/2007	9		No procesado
-02614_07	<i>Culex quinquefasciatus</i>	02/08/2007	9		No procesado
-02655_01	<i>Culex quinquefasciatus</i>	03/08/2007	5	<i>Gallus gallus</i>	+ Blood
-02754_01	<i>Culex quinquefasciatus</i>	10/08/2007	10	<i>Gallus gallus</i>	+ Blood
-02754_02	<i>Culex quinquefasciatus</i>	10/08/2007	10	<i>Gallus gallus</i>	+ Blood
-02754_03	<i>Culex quinquefasciatus</i>	10/08/2007	10	<i>Gallus gallus</i>	+ Blood
-02754_04	<i>Culex quinquefasciatus</i>	10/08/2007	10	<i>Gallus gallus</i>	+ Blood
-02754_05	<i>Culex quinquefasciatus</i>	10/08/2007	10	<i>Gallus gallus</i>	+ Blood
-02779_01	<i>Culex quinquefasciatus</i>	09/08/2007	6	<i>Gallus gallus</i>	+ Blood
-02779_02	<i>Culex quinquefasciatus</i>	09/08/2007	6	no ID	
-02882_01	<i>Culex quinquefasciatus</i>	09/08/2007	3	no ID	
-08140_01	<i>Culex quinquefasciatus</i>	30/08/2007	6	<i>Gallus gallus</i>	+ Blood
-08140_02	<i>Culex quinquefasciatus</i>	30/08/2007	6	<i>Gallus gallus</i>	+ Blood
-08140_03	<i>Culex quinquefasciatus</i>	30/08/2007	6	<i>Gallus gallus</i>	+ Blood
-08140_04	<i>Culex quinquefasciatus</i>	30/08/2007	6	<i>Felis catus</i>	+ MAMAVI, Mam. Secuenciado Ago-08. %Identity/E-value 99/0.0
-08166_01	<i>Culex quinquefasciatus</i>	30/08/2007	10	<i>Gallus gallus</i>	+ Blood. Banda tenue
-08210_01	<i>Culex quinquefasciatus</i>	30/08/2007	4	<i>Gallus gallus</i>	+ Blood
-08213_01	<i>Culex quinquefasciatus</i>	30/08/2007	9	no ID	
-08219_01	<i>Culex quinquefasciatus</i>	30/08/2007	9	<i>Gallus gallus</i>	+ Blood. Banda tenue
-09646_01	<i>Culex quinquefasciatus</i>	30/08/2007	5	no ID	
-09710_01	<i>Culex quinquefasciatus</i>	30/08/2007	6	<i>Gallus gallus</i>	+ Blood
-09710_02	<i>Culex quinquefasciatus</i>	30/08/2007	6	<i>Gallus gallus</i>	+ Blood
-09710_03	<i>Culex quinquefasciatus</i>	30/08/2007	6	no ID	
-09710_04	<i>Culex quinquefasciatus</i>	30/08/2007	6	no ID	
-09710_05	<i>Culex quinquefasciatus</i>	30/08/2007	6	no ID	
-09710_06	<i>Culex quinquefasciatus</i>	30/08/2007	6	<i>Gallus gallus</i>	+ Blood
-09799_01	<i>Culex quinquefasciatus</i>	19/09/2007	3	<i>Gallus gallus</i>	+ Blood
-09799_02	<i>Culex quinquefasciatus</i>	19/09/2007	3	no ID	
-10027_01	<i>Culex quinquefasciatus</i>	20/09/2007	3	no ID	
-10066_01	<i>Culex quinquefasciatus</i>	20/09/2007	3	no ID	
-10066_02	<i>Culex quinquefasciatus</i>	20/09/2007	3	no ID	
-10464_01	<i>Culex quinquefasciatus</i>	23/09/2007	4	<i>Gallus gallus</i>	+ Blood
-10468_01	<i>Culex quinquefasciatus</i>	23/09/2007	4	<i>Gallus gallus</i>	+ Blood
-10468_02	<i>Culex quinquefasciatus</i>	23/09/2007	4	<i>Gallus gallus</i>	+ Blood
-10514_01	<i>Culex quinquefasciatus</i>	23/09/2007	5	<i>Gallus gallus</i>	+ Blood
-10591_01	<i>Culex quinquefasciatus</i>	24/09/2007	6	no ID	No procesado
-11348_01	<i>Culex quinquefasciatus</i>	28/09/2007	4	no ID	
-11354_01	<i>Culex quinquefasciatus</i>	28/09/2007	4	no ID	
-11354_02	<i>Culex quinquefasciatus</i>	28/09/2007	4	<i>Canis familiaris</i>	+ MAMAVI, Mam. + Blood
-11354_03	<i>Culex quinquefasciatus</i>	28/09/2007	4	<i>Gallus gallus</i>	+ Blood
-11494_01	<i>Culex quinquefasciatus</i>	08/11/2007	6	<i>Canis familiaris</i>	+ MAMAVI CJ. + Blood
-11494_02	<i>Culex quinquefasciatus</i>	08/11/2007	6	no ID	
-11494_03	<i>Culex quinquefasciatus</i>	08/11/2007	6	<i>Gallus gallus</i>	+ Blood
-11494_04	<i>Culex quinquefasciatus</i>	08/11/2007	6	no ID	
-11503_01	<i>Culex quinquefasciatus</i>	08/11/2007	6	no ID	
-11548_01	<i>Culex quinquefasciatus</i>	09/11/2007	10	<i>Canis familiaris</i>	+ MAMAVI, Mam. + Blood
-11548_02	<i>Culex quinquefasciatus</i>	09/11/2007	10	no ID	
-11565_01	<i>Culex quinquefasciatus</i>	09/11/2007	4	<i>Gallus gallus</i>	+ Blood
-11565_02	<i>Culex quinquefasciatus</i>	09/11/2007	4	<i>Gallus gallus</i>	+ Blood
-11565_03	<i>Culex quinquefasciatus</i>	09/11/2007	4	no ID	
-11565_04	<i>Culex quinquefasciatus</i>	09/11/2007	4	no ID	

Número de identificación (GU-2007) <sup>a</sup>	Género y especie	Fecha de colecta	Cuadrante <sup>b</sup>	Ingesta Sangínea <sup>c</sup>	Comentarios <sup>d</sup>
-11565_05	<i>Culex quinquefasciatus</i>	09/11/2007	4	<i>Gallus gallus</i>	+ Blood
-11565_06	<i>Culex quinquefasciatus</i>	09/11/2007	4	Otro	+ MAMAVI CJ, 290 pb - Blood
-11565_07	<i>Culex quinquefasciatus</i>	09/11/2007	4	<i>Gallus gallus</i>	+ Blood
-11565_08	<i>Culex quinquefasciatus</i>	09/11/2007	4	<i>Gallus gallus</i>	+ Blood
-11565_09	<i>Culex quinquefasciatus</i>	09/11/2007	4	no ID	
-11565_10	<i>Culex quinquefasciatus</i>	09/11/2007	4	<i>Gallus gallus</i>	+ Blood
-11565_11	<i>Culex quinquefasciatus</i>	09/11/2007	4	no ID	
-11565_12	<i>Culex quinquefasciatus</i>	09/11/2007	4	<i>Gallus gallus</i>	+ Blood
-11565_13	<i>Culex quinquefasciatus</i>	09/11/2007	4	<i>Gallus gallus</i>	+ Blood
-11565_14	<i>Culex quinquefasciatus</i>	09/11/2007	4	<i>Felis catus</i>	+ MAMAVI, Mam. Secuenciado Ago-08. %Identity/E-value 99/0.0
-11565_15	<i>Culex quinquefasciatus</i>	09/11/2007	4	<i>Felis catus</i>	+ MAMAVI, Mam. Secuenciado Ago-08. %Identity/E-value 99/0.0
-11575_01	<i>Culex quinquefasciatus</i>	09/11/2007	4	<i>Felis catus</i>	BLOOD Gallina 300pb. + MAMAVI, Mam. Secuenciado Ago-08. %Identity/E-value 99/5e-155
-11575_02	<i>Culex quinquefasciatus</i>	09/11/2007	4	no ID	Producto BLOOD Gallina, NO de tamaño esperado 300pb.
-11786_01	<i>Culex quinquefasciatus</i>	01/12/2007	4	<i>Gallus gallus</i>	+ Blood
-11786_02	<i>Culex quinquefasciatus</i>	01/12/2007	4	no ID	
-11786_03	<i>Culex quinquefasciatus</i>	01/12/2007	4	<i>Gallus gallus</i>	+ Blood
-11786_04	<i>Culex quinquefasciatus</i>	01/12/2007	4	<i>Gallus gallus</i>	+ Blood
-11811_01	<i>Culex quinquefasciatus</i>	01/12/2007	6	no ID	
-11811_02	<i>Culex quinquefasciatus</i>	01/12/2007	6	<i>Gallus gallus</i>	+ Blood
-11832_01	<i>Culex quinquefasciatus</i>	06/12/2007	6	no ID	
-11841_01	<i>Culex quinquefasciatus</i>	06/12/2007	6	<i>Gallus gallus</i>	+ Blood
-11841_02	<i>Culex quinquefasciatus</i>	06/12/2007	6	Mamífero	+ MAMAVI, Mam. Secuenciado Ago-08. <i>Gallus gallus</i> %Identity/E-value 98/4e-131
-11841_03	<i>Culex quinquefasciatus</i>	06/12/2007	6	no ID	
-11841_04	<i>Culex quinquefasciatus</i>	06/12/2007	6	<i>Canis familiaris</i>	+ MAMAVI, CJ. + Blood
-11841_05	<i>Culex quinquefasciatus</i>	06/12/2007	6	no ID	

<sup>a</sup>Número único de clasificación de individuo (GU-2007-XXXXX\_XX).

<sup>b</sup>Cuadrantes de colecta de zancudos, 3-6 (urbanos) y 9-10 (peri-urbanos).

<sup>c</sup>No ID: Hospedero no identificado por pruebas moleculares.

<sup>d</sup>Resultado detallado de las pruebas. MAMAVI CJ: PCR para orden con cebadores de Cicero y Johnson (2001); Blood: PCR múltiple con cebadores para especies de mamíferos de Kent y Norris (2005); MAMAVI, Mam: PCR con cebadores para mamífero de Ngo & Kramer (2003).

APENDICE III. Resultados análisis estadístico GraphPad Prism 5.01

This file contains 4 data tables and 1 info tables:

- [Project info 1](#)
- [Densidad Incidencia](#)
- [Estacionalidad-mes](#)
- [Habitat](#)
- [Estacionalidad](#)

**Project info 1**

Notes

Constant	Name
Experiment Date	2009-07-10
Experiment ID	Ing_Sang_2007
Notebook ID	
Project	Ingesta Sanguinea <u>Cx. quinquefasciatus</u>
Experimenter	AGonzalez
Protocol	

**Densidad\_Incidencia**

	Densidad	Incidencia
Enero	2.444444	0
Febrero	6.758621	0
Marzo	4.95	0
Abril	18.9	0
Mayo	53.25	3
Junio	22.8	17
Julio	16.65	19
Agosto	6.2	15
Septiembre	5	0
Octubre	6.25	4
Noviembre	3.9	0

**Estacionalidad-mes**

	Aves silvestres	Gallina	Otras aves domésticas	Perros	Otros mamíferos
Feb	0	3	1	0	0
Mar	0	0	1	0	0
May	3	46	8	4	1
Jun	1	32	8	2	0
Jul	0	12	0	0	0

Ago	0	46	1	6	1
Sep	0	6	0	1	3
Oct	0	9	1	2	0
Nov	0	5	0	1	1

### Habitat

	Gallinas	Otra aves domésticas	Aves silvestres	Otras aves	Perros	Otros mamíferos
Urbano	87	0	3	3	13	6
Peri-urbano	72	15	1	8	3	0

### Estacionalidad

	Aves silvestres	Gallina	Otras aves domésticas	Perros	Otros mamíferos
Seco	4	81	18	6	1
Humedo	0	78	2	10	5

This file contains 4 data tables and 0 info tables:

- [Correlation of Densidad Incidencia](#)
- [Contingency of Estacionalidad-mes](#)
- [Contingency of Habitat](#)
- [Contingency of Estacionalidad](#)

### Correlation of Densidad\_Incidencia

	Incendencia
Number of XY Pairs	11
Spearman r	0.5254
95% confidence interval	-0.1291 to 0.8611
P value (two-tailed)	0.1003
P value summary	ns
Exact or approximate P value?	Exact
Is the correlation significant? (alpha=0.05)	No

### Contingency of Estacionalidad-mes

	Data Set-A
Table Analyzed	Estacionalidad-mes

Chi-square	
Chi-square, df	62.11, 32
P value	0.0011
P value summary	**
One- or two-sided	NA
Statistically significant? (alpha<0.05)	Yes
Data analyzed	
Number of rows	9
Number of columns	5

### Contingency of Habitat

	Data Set-A	
Table Analyzed	Habitat	
Chi-square		
Chi-square, df	31.26,	5
P value	<	0.0001
P value summary	***	
One- or two-sided	NA	
Statistically significant? (alpha<0.05)	Yes	
Data analyzed		
Number of rows	2	
Number of columns	6	

### Contingency of Estacionalidad-HR

	Data Set-A	
Table Analyzed	Estacionalidad	
Chi-square		
Chi-square, df	19.53,	4
P value	0.0006	
P value summary	***	
One- or two-sided	NA	
Statistically significant? (alpha<0.05)	Yes	
Data analyzed		
Number of rows	2	
Number of columns	5	