



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE
SAN LUIS POTOSÍ
FACULTAD DE MEDICINA**



**Centro de Investigación en Ciencias de la Salud
y Biomedicina (CICSaB)**



**ESTUDIO PILOTO DE LA VIGILANCIA
EPIDEMIOLÓGICA DE ARBOVIRUS EN MOSQUITOS**

TESIS QUE PRESENTA

IBP MARÍA FERNANDA WONG ARCE

**PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRA
EN CIENCIAS BIOMÉDICAS BÁSICAS**

CODIRECTORES DE TESIS
DRA SANDRA E. GUERRA PALOMARES
DR. CHRISTIAN A. GARCÍA SEPÚLVEDA

Agosto 2019

CREDITOS INSTITUCIONALES

Esta tesis se llevó a cabo en el Laboratorio de Genómica Viral y Humana de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de San Luís Potosí, bajo la tutoría de la Dra. Sandra E. Guerra Palomares y el Dr. Christian A. García Sepúlveda, gracias al apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología que otorgó la beca con número 477089. Para la realización de este trabajo se utilizaron los recursos propios del Laboratorio de Genómica Viral y Humana de la Facultad de Medicina de la U.A.S.L.P.

Tesis que presenta:

IBP María Fernanda Wong Arce

PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS BÁSICAS

CODIRECTOR DE TESIS

Dra. Sandra E. Guerra Palomares

Dr. Christian A. García Sepúlveda

ASESORES INTERNOS

Dra. Claudia G. Castillo Martín del Campo

Dr. Fernando Díaz-Barriga Martínez

JURADO

Dra. Sandra E. Guerra Palomares

Dra. Claudia G. Castillo Martín del Campo

Dra. Adriana E. Monsiváis Urenda

Dr. Christian A. García Sepúlveda

Agosto 2019

RESUMEN

Introducción: Dengue, Zika y Chikungunya son enfermedades infecciosas emergentes causadas por arbovirus y transmitidas por mosquitos. Las semejanzas clínicas de las tres enfermedades, principalmente durante la fase aguda, dificultan su distinción diagnóstica y el manejo médico oportuno de sus complicaciones. Las estrategias tradicionales de monitoreo epidemiológico se basan en la identificación de casos humanos. La abundancia de mosquitos en comunidades remotas, mal comunicadas y con pobre acceso sanitario incrementa la morbi-mortalidad de estas enfermedades e implica dificultades logísticas y tecnológicas para su vigilancia. Este estudio evaluó la factibilidad de un sistema de vigilancia de arbovirus y sus vectores novedoso, de bajo costo y específicamente diseñado para las condiciones climáticas y geográficas de estas comunidades. **Materiales y métodos:** Se evaluaron cinco tipos de trampas pasivas para mosquitos equipadas con atrayentes químicos y con dispositivos de recolección y preservación de ácidos nucleicos virales (tarjetas FTA impregnadas con miel). Se diseñó un sistema de Confinamiento de Bioseguridad de Mosquitos (BMC) vivos que incrementa las posibilidades de detección viral. Se desarrollaron herramientas moleculares para la detección de arbovirus y para la identificación taxonómica de mosquitos. **Resultados:** En total se capturaron 26,426 mosquitos empleando entre 6 y 10 trampas durante 5 noches distribuidas a lo largo de 3 semanas. La mejor tasa de captura fue de 440 mosquitos por noche (95% CI, 314 - 840). La tasa de alimentación en trampas equipadas con tarjetas FTA fue de $43 \pm 10\%$. Fue posible detectar la presencia de virus en tarjetas FTA almacenadas a 40°C y $>90\%$ de humedad relativa (simulando condiciones ambientales de la Huasteca Potosina) hasta el día +15. El 74% de las SSP-PCR multiplex de taxonomía molecular fueron informativas con una abundancia de especies de 55% *Aedes*, 30% de *Anopheles* y 15% de *Culex*. **Conclusiones:** El sistema desarrollado demostró factibilidad y transferibilidad a comunidades vulnerables para la vigilancia epidemiológica de arbovirus y sus vectores mucho antes del surgimiento de casos humanos. El sistema BMC no solo permite incrementar las posibilidades de detección sino podría ser empleado como un sistema cerrado para la entrega de arbovirus en estudios de infecciones experimentales de mosquitos.

Palabras clave: arbovirus, trampas para mosquitos, vigilancia epidemiológica.

1.0 INTRODUCCIÓN

Las enfermedades infecciosas emergentes (EIE) son aquellas cuya incidencia ha incrementado en los últimos 20 años y de las cuales no se prevé una disminución en un futuro cercano¹⁻³. Dengue es la enfermedad transmitida por mosquitos más común de las Américas y la causa más probable de fiebre en pacientes de regiones endémicas. No obstante, la co-circulación reciente de nuevos arbovirus (el virus del Chikungunya en el 2013 y el virus del Zika en el 2014) ha representado un nuevo reto para la salud pública de las Américas⁴. Las tres enfermedades arbovirales presentan manifestaciones clínicas muy similares, especialmente durante la fase aguda (los primeros días de la enfermedad), dificultando el diagnóstico clínico por parte del personal de salud y en ocasiones evitando el manejo médico del caso, con consecuencias fatales en algunos de ellos. El diagnóstico serológico de las tres enfermedades también enfrenta dificultades debido a las semejanzas antigénicas de los virus causales, lo que da lugar a reacciones cruzadas y dificulta su vigilancia epidemiológica⁵.

Dengue es causado por el virus del dengue (DENV). Es una de las EIE's más antiguas, detectada por primera vez en África pero subestimada hasta la epidemia de 1780 que afectó además de a África y Asia a América del Norte. En 1907 el dengue representaba la segunda infección viral más común a nivel mundial solo después de la fiebre amarilla. De 1960 al 2010 la incidencia de dengue se había incrementado hasta 30 veces⁶⁻⁸. Se desconoce el número exacto de casos anuales de dengue. No obstante, en el 2016 se estima ocurrieron 96 millones de casos clínicos (CI 95%, 67-136 millones) a nivel mundial, de los cuales alrededor de 500,000 progresaron hacia etapas más severas de la enfermedad y 20,000 a la muerte. Actualmente, el dengue es endémico en más de 120 países y 50% de la población a nivel mundial se considera en riesgo de infección (Dengue and severe dengue, World Health Organization, April 2019). Zika es causado por el virus de Zika (ZIKV). Este virus fue aislado por primera vez de un mono macaco en 1947 en el bosque de Zika, Uganda.

En el 2007 en la isla de Yap de la Micronesia se registró el primer brote durante el cual más del 70% de la población fue infectada. En octubre del 2013 la circulación de ZIKV fue confirmada en la Polinesia Francesa y para abril del 2014 alrededor de 30,000 personas habían sido infectadas^{9, 10}. Durante ambos brotes de Zika se demostró una asociación con el incremento de casos de síndrome de Guillan-Barré (GBS)¹¹. Durante el 2014 el virus se diseminó rápidamente a otras islas del Pacífico llegando en 2015 a las Américas. Desde entonces y hasta el 2018 en las Américas se han documentado 500,000 casos probables. Actualmente Zika es endémico en ~84 países a nivel mundial (Zika Cumulative Cases, Pan American Health Organization, January 2018)^{12, 13}. Chikungunya, ocasionado por el virus de Chikungunya (CHIKV), fue identificado por primera vez en 1952 en Tanzania, África. Los brotes de Chikungunya se habían circunscrito a los continentes de África y Asia hasta el 2007 en que se reportó el primer caso en Europa y ulteriormente en el 2015 en que el virus llegó a América¹⁴⁻¹⁶. El brote actual es considerado el más importante de Chikungunya a la fecha con un total de 693,936 casos sospechosos y 37,480 confirmados. A finales del 2017 el virus era endémico en más de 60 países a nivel mundial¹⁷. Dengue, Zika y Chikungunya presentan manifestaciones clínicas muy similares lo que complica la distinción clínica y el diagnóstico certero. Entre las manifestaciones clínicas de las tres se incluyen: fiebre, conjuntivitis, artralgias, mialgias, erupción cutánea, cefalea, edema en extremidades al igual que signos de fragilidad capilar (petequias y equimosis). No obstante, las tres enfermedades difieren en el tipo de complicaciones o secuelas que ocasionan, lo que resalta la necesidad de distinguirlas clínicamente. Algunos casos de Dengue progresan hacia dengue grave caracterizado en ocasiones por manifestaciones hemorrágicas y alta mortalidad. El Zika, al tratarse de un virus neurotrópico, se complica frecuentemente con síndrome de Guillan-Barré, meningoencefalitis y mielitis aguda. De extrema preocupación en el caso de Zika es la ocurrencia de microcefalia en bebés nacidos de madres que fueron infectadas durante el embarazo. Por último, en algunos pacientes con Chikungunya las artralgias pueden volverse crónicas y acompañarse de degeneración articular y disminución de la calidad de vida¹². A pesar de que la presencia de Dengue en el continente americano se remonta a hace más de 200

años, fue hasta la primera mitad del siglo XIX cuando se documentaron los primeros casos en México. En base a la información obtenida del Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica (SINAVE) de los últimos 4 años, del 2015 al 2018 la incidencia de dengue había disminuido en México, con 12,706 casos confirmados anuales en el 2018. Durante el 2019 las cifras de incidencia de dengue indican una tendencia a la alta. Para la semana epidemiológica 32 (información actualizada al 10 de agosto del 2019) se reporta la incidencia acumulada de 8,023 casos confirmados lo cual contrasta con los 2,576 casos confirmados reportados durante el mismo período del 2018. El primer caso humano de Zika en las Américas se reportó en el 2015 en Chile y un año después se documentó un caso en México. La mayor incidencia anual de Zika en México se reportó en el 2016 con 7,560 casos confirmados. A partir de ese año la incidencia de Zika en México ha disminuido paulatinamente. Para la semana epidemiológica 32 del año en curso (actualizado al 10 de agosto del 2019) se han reportado 43 casos confirmados de Zika. El virus de Chikungunya llegó a México en el 2015 siendo este responsable de 11,577 casos. Desde entonces, la incidencia de dicha enfermedad ha disminuido. A la semana epidemiológica 32 (actualizado al 10 de agosto del 2019) se reportan 3 casos confirmados de dicha enfermedad (Panorama epidemiológico de dengue 2019, SINAVE) (Boletín epidemiológico 2019, SINAVE).

DENV, ZIKV y CHIKV son transmitidos por artrópodos, por lo cual se les conoce como arbovirus (Eng.: *arthropod-borne viruses*). Los principales vectores de estos tres virus son las hembras hematófagas de mosquitos del género *Aedes*, *Anopheles* y *Culex*¹⁸⁻²⁰. *Aedes aegypti* también conocido como mosquito de la fiebre amarilla, habita regiones tropicales y subtropicales y cuenta con una gran capacidad vectorial, siendo el principal responsable de la transmisión de estas tres enfermedades. *Ae. aegypti* se caracteriza por su capacidad para alimentarse en múltiples ocasiones durante el mismo día. *Ae. aegypti* es antropofílico ya que se alimenta preferentemente de humanos y vive en zonas urbanas (intra/peridoméstico), prefiriendo depósitos de agua "artificiales" como llantas o cubetas para depositar sus huevos. La especie *Aedes albopictus* (mosquito atigrado de Asia) ha cobrado mayor

importancia como vector del dengue a pesar de tener una menor capacidad vectorial en comparación a *Ae. aegypti*. Habita en regiones tropicales y templadas, preferentemente en zonas silvestres y no en las urbanas, se alimenta tanto de humanos como de otros animales y completa su ciclo gonadotrópico con una sola comida. Cuenta con mayor capacidad de vuelo y se ha ido adaptando paulatinamente a regiones con mayor altitud al igual que a temperaturas más bajas, aumentando con ello la posible distribución geográfica de la enfermedad. Morfológicamente *Ae. aegypti* y *albopictus* son muy similares; poseen un patrón de manchas blancas característico en el abdomen y patas. No obstante, se diferencian uno de otro en que el torso de *Ae. aegypti* cuenta con escamas blancas en forma de lira mientras que *Ae. albopictus* únicamente posee una línea blanca recta longitudinal en el centro del torso (Mosquito factsheets, European Centre for Disease Prevention and Control, December 2016) (Enfermedades transmitidas por vector, Centro Nacional de Programas Preventivos y Control de Enfermedades, Diciembre 2014)¹⁷. Hoy en día México cuenta con un sistema de vigilancia epidemiológica basado en la detección de casos humanos. Este sistema tiene la desventaja de que no ofrece tiempo suficiente para iniciar maniobras de control de vector que sean oportunas. Adicionalmente, la identificación de casos sospechosos o probables requiere del acceso de los pacientes a los servicios de salud gubernamentales, acceso que desafortunadamente no es posible para las comunidades más apartadas geográfica, social y económicamente (las más vulnerables a estas enfermedades). Adicionalmente, la referencia de muestras biológicas de éstos pacientes a centros de diagnóstico especializado requiere de una red logística de transporte que depende de una red fría y control estricto de condiciones de transporte. Aunado a esto, el diagnóstico serológico de estas enfermedades, el acercamiento más usual y de menor costo para aplicaciones epidemiológicas, se presta a las reacciones cruzadas anteriormente mencionadas. Algunos países, como Australia, han implementado estrategias de vigilancia arboviral basados en la detección de virus a partir del estudio de las poblaciones de mosquitos. Para estas estrategias se ha adoptado el uso de animales centinela en el que se colocan animales susceptibles de la infección arboviral al ataque por mosquitos, pasado cierto tiempo se muestrea al animal en

busca del virus de interés. Además de ser costoso y logísticamente demandante, este sistema tiene el inconveniente de que brinda un hospedero capaz de participar en la cadena de incubación/transmisión de las mismas enfermedades que busca detectar²¹. En los últimos años, se han desarrollado estrategias de vigilancia epidemiológica basadas en la detección del virus en mosquitos mediante su captura por medio de trampas especializadas. Estas estrategias de vigilancia han sido empleadas por países como Australia y Estados Unidos para la detección de los arbovirus RRV (Ross River Virus), BFV (Barmah Forest Virus), MVEV (Murray Valley Encephalitis Virus) y WNV (West Nile Virus). Dichas trampas hacen uso de varias estrategias de atracción de mosquitos incluyendo generadores de CO₂, mimetizantes de humedad y olor del sudor animal (octenol), señales visuales, luz, etc. Dichas trampas pueden ser pasivas (que no requieren de energía) o activas (con ventiladores o luces que dependen de una fuente de energía). Muchos de estos acercamientos de monitoreo de vectores emplean a los mosquitos capturados para realizar ensayos de tamizaje de arbovirus subsecuentes empleando ya sea pools de mosquitos o mosquitos individuales. El éxito de captura de las trampas depende de su capacidad para confundirse con un animal. El principal estímulo necesario para atraer un mosquito es el CO₂. El mosquito comienza a volar en zigzag hasta encontrar una pluma de CO₂ y una vez localizada comenzará la búsqueda del animal por medio de estímulos visuales. El mosquito se aproximará a los objetos que observe cerca de él y en ellos buscará características propias de los animales como calor, humedad, y otros compuestos volátiles secretados por la piel. De no encontrar todas las características necesarias, regresará a la pluma de CO₂ para aproximarse al siguiente objeto. Una vez que detecte todos los estímulos procederá a alimentarse de dicho animal.

Recientemente, se planteó una alternativa basada en la incorporación de tarjetas FTA (Whatman® FTA® Cards), cuya utilidad para almacenar DNA a temperatura ambiente y en ausencia de red fría ya ha sido demostrada²¹⁻²³. Al impregnar tarjetas FTA con miel integradas a las trampas de captura, se les brinda a los mosquitos capturados una fuente alternativa de alimento durante su cautiverio²⁴. Si bien las

hembras de los mosquitos se alimentan de manera preferencial de sangre animal con motivo de la ovoposición (de la cual aprovechan el alto contenido de hierro y proteína), también se alimentan de manera natural de néctar, algas y materia orgánica diversa. Al alimentarse de las tarjetas impregnadas con miel (o incluso con tan solo sondearlas con la probóscide), los mosquitos regurgitan y depositan arbovirus presentes en su saliva o tracto gastrointestinal en la misma. La evaluación de dichas tarjetas (normalmente una sola por trampa) posteriormente a través de métodos moleculares basados en la amplificación de ácido nucleicos facilita así el tamizaje de arbovirus en toda la población de mosquitos que se han alimentado de dicha tarjeta^{21, 22}. La incorporación de colorante alimenticio a la tarjeta impregnada con miel normalmente es empleada para visualizar su presencia en el abdomen de mosquitos con el fin de evaluar la tasa de mosquitos capturados que si se alimentaron de la tarjeta. Johnson *et. al.* expuso a 500 mosquitos en cautiverio durante 3 días a una tarjeta FTA impregnada con miel y colorante alimenticio diferente en cada día y contabilizó el número de veces que los mosquitos se alimentaban de acuerdo a la combinación de colores visualizados en sus abdómenes. Encontró que el $80\% \pm 6.5\%$ de los mosquitos se alimentaron al menos una vez, el $29.2\% \pm 11.5\%$ se alimentaron al menos dos veces y $8.5\% \pm 2.9\%$ se alimentaron 3 veces durante ese tiempo²¹. Posteriormente, Hall-Mendelin *et. al.* observó que es posible detectar vRNA en las tarjetas FTA en ausencia de evidencia de que los mosquitos se hubiesen alimentado, demostrando así que basta con que el mosquito sondee la tarjeta con su probóscide (sin alimentarse) para depositar virus en ellas²². Van de Hurk *et. al.* logró detectar RRV, BFV y WNV en diversas regiones de Australia empleando tarjetas FTA impregnadas con miel²⁵. A pesar de las ventajas del uso de tarjetas FTA, es importante considerar que el número de tarjetas positivas en estudios publicados es bajo. Esto puede deberse a la ausencia del virus en vectores, a la presencia del virus en un pequeño porcentaje de los vectores de la región, a baja carga viral en vectores, baja tasa de alimentación dentro de trampas, entre otros factores. Es por ello que es necesario desarrollar métodos moleculares que garanticen una alta capacidad, eficiencia y sensibilidad para la extracción, purificación y detección de ácido nucleicos virales. Actualmente se utilizan RT-PCR

en tiempo real o punto final para la detección de vRNA debido su alta sensibilidad y especificidad para detectar cada virus sin presentar reacciones cruzadas, típicas de acercamientos serológicos. Este estudio plantea evaluar el desempeño de un sistema de advertencia temprana de arbovirosis en México que integra las cualidades de varios estudios previamente publicados junto con importantes innovaciones que hemos implementado en relación al diseño y uso de trampas, la preservación y extracción de RNA viral, la extracción y asignación de taxonomía molecular de mosquitos basada en DNA y el desarrollo de un sistema de amplificación de virus en cautiverio (BMC) y de un sistema de biocontención para la entrega de arbovirus en infecciones experimentales de mosquitos. El empleo de este sistema de vigilancia de arbovirosis y de sus vectores en México podría transferirse fácilmente a otras regiones del país (u otros países del mundo) dado su bajo costo, bajas demandas logísticas en relación al transporte de muestras, baja dependencia humana (al hacer uso de taxonomía molecular y tamizaje molecular) y gozaría del enorme potencial predictivo de brotes o casos humanos.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Diseño de trampas

2.1.1 Evaluación de las trampas.

Se desarrollaron 4 trampas pasivas tomando como modelo de referencia la "Sentinel mosquito arbovirus capture kit" (SMACK)²¹. A diferencia de la SMACK, nuestro diseño incorpora un dispensador de atrayente de mosquitos mimetizador del sudor animal (octenol). Las trampas diseñadas se nombraron "Yoy" en referencia a la palabra Téneek para mosquito. Cuatro volúmenes diferentes de trampas Yoy fueron evaluados (1.5 L, 2 L, 5 L y 10 L) ver **Figura 1**, panel A, B, C y D. Las consideraciones de diseño incluyeron: hacer uso de materiales reciclables (botellas de PET, esponjas), construcción simple y económica (tubería PVC, tubos cónicos de 15 mL) y que incorporara 1) un embudo de entrada fabricado con malla mosquitera con diámetro menor de 5 cm y el mayor ajustado al diámetro de la botella, 2) un sistema de humidificación pasiva, 3) un sistema de aportación de CO₂ a más de 400 mL/minutos (equiparable al doble de lo exhalado por un ser humano promedio por

minuto) y 4) un sistema de recolección de ácidos nucleicos virales a través de una tarjeta FTA impregnada con miel suplementada con colorante alimenticio. Para evaluar el desempeño de las trampas se realizó un estudio de cuadros latinos 4x4 donde cada noche las trampas fueron rotadas por cuatro sitios diferentes (la trampa Yoy-1.5 fue eliminada del estudio ya que su embudo de entrada no demostró permitir la entrada de mosquitos en ensayos iniciales). Las trampas se colocaban a las 18:00 horas y eran recolectadas a las 07:00 h del día siguiente (13 horas de captura neta). Dichas evaluaciones se realizaron durante septiembre del 2018 en los jardines frontales del edificio de la Coordinación para la Innovación y Aplicación de Ciencia y Tecnología (CIACyT) de la UASLP. Las trampas fueron colocadas a ~30 cm del suelo, ya que en ensayos iniciales esta altura resultó ser mejor que la de 1.5 metros. Dos trampas eran suministradas de CO₂ a partir de un solo generador cargado con 3 kg de hielo seco (anhídrido carbónico sólido).

2.1.2 Generador de CO₂

Teniendo en cuenta que el ser humano promedio exhala entre 200 - 400 mL de CO₂ por minuto, se consideró incorporar un sistema capaz de aportar un flujo mínimo de 200 mL de CO₂/min a cada trampa^{26, 27}. Se realizó una comparación entre generadores de levadura, hielo seco y un cilindro de gas comprimido. Para los generadores a base de levadura se emplearon 35 g de levadura y 500 g de azúcar disueltos en 2.5 L de agua tibia²⁶. Se dejó reposar la solución por una hora para permitir la activación de la levadura y posteriormente se realizó una medida del gasto de CO₂ cada 2 horas durante 12 horas. Para los generadores de hielo seco se colocaron 1.5 kg de CO₂ en una botella de plástico sin ningún tipo de recubrimiento térmico y se midió el tiempo que tardaba en sublimarse la totalidad del hielo seco calculando entonces el flujo teórico producido, tomando en cuenta que 454 g de CO₂ producen 249 L de CO₂ gaseoso. Así mismo, se realizaron mediciones experimentales del gasto generado. No fue necesario medir el gasto de los cilindros de gas comprimido ya que estos estaban equipados con válvulas y flujómetros.

2.1.3 Tarjetas FTA impregnadas por miel y sistema de alimentación con tarjetas FTA

Se utilizó miel con colorante como fuente de alimento alternativo para los mosquitos capturados en las trampas. Para ello se cortaron tarjetas FTA circulares de 1.63 in². Para su impregnación se formó un sándwich de tres tarjetas donde las dos tarjetas externas fueron sumergidas en miel al 100% durante 5 min eliminando el exceso de la miel, y a continuación colocando una tarjeta no impregnada en medio de ambas a manera de "sándwich". El sándwich de tarjetas se forró con papel aluminio y se colocó bajo presión durante una noche. El tiempo requerido para lograr el balance de impregnación de miel de las tres tarjetas fue evaluado durante 1, 3 y 6 horas empleando para ello una balanza analítica para obtener el peso de miel absorbido por cada tarjeta. Las tarjetas fueron colocadas en un sistema de alimentación con tarjetas FTA optimizado que consistió en un frasco de 40 mL que contenía una esponja impregnada con miel al 50%. La tapa de este frasco se encontraba agujerada para permitir el acceso de los mosquitos a la tarjeta.

2.2 Sistema de confinamiento de bioseguridad de mosquitos (BMC)

Algunos estudios han demostrado que los mosquitos continúan alimentándose de las tarjetas FTA con miel hasta 3 días después de su captura²¹. Debido a esto y con tal de maximizar la posibilidad de detectar arbovirus en las tarjetas, se realizó el diseño de un sistema de confinamiento que permitiera almacenar en cautiverio a los mosquitos vivos para permitirles (obligarlos) continuar alimentándose de las tarjetas por hasta 72 h. El sistema de confinamiento desarrollado consistió en un contenedor de plástico comercial de 10 litros al cual se le realizaron dos orificios en la parte inferior de la caja (parte superior del sistema BMC) que sirvieran como puertos para acoplar dos *sistemas de alimentación con tarjetas FTA*. Adicionalmente se abrió una ventila de 10 x 10 cm en un extremo del contenedor para permitir la entrada de aire, apertura que fue recubierta con doble malla mosquitera. Dentro de la jaula se colocó un recipiente con una microfibra empapada en agua como sistema de humidificación y a lo largo de las paredes de la jaula se colocaron anillos de plástico (obtenidos de botellas de PET de 1.5 L recicladas) para brindarles superficie de reposo a los

mosquitos (**Figura 2**). La transferencia de mosquitos desde las trampas de captura a los BMC's se realizó empleando una aspiradora doméstica en un espacio exterior para evitar la liberación de mosquitos en laboratorio.

2.3 Herramientas moleculares

2.3.1 Extracción de DNA a partir de mosquitos

El DNA genómico de mosquitos se extrajo mediante el método de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (PCI) por considerarse el estándar de oro de extracción²⁸⁻³⁰. Adicionalmente aprovechamos la oportunidad para optimizar la técnica Dråbek localmente modificada para la extracción de DNA humano a partir de concentrados leucocitarios para la extracción de DNA de mosquito³¹⁻³³. Para extraer el DNA por medio de Dråbek se maceró el mosquito (tras descartar el abdomen) en 25 µL de PBS 1x con ayuda de una varilla de vidrio y posteriormente se completó el volumen de PBS 1x a 200 µL. Se adicionaron 200 µL de buffer de lisis celular (Tritón X-100, sacarosa, MgCl₂*6H₂O, Tris-HCl 1 M pH 7.6) y se mezcló por vortex. Se centrifugó a 15,000 g por 5 min y se descartó el sobrenadante. Se realizó una segunda lisis celular con 200 µL de buffer de lisis y nuevamente se centrifugó y descartó el sobrenadante. A continuación, se agregaron 37.5 µL de Tris-HCl 10 mM pH 8, 37.5 µL de una solución de detergente 40 mg/mL y 3.125 µL de NaCl 5 M. Se mezcló por vortex y se centrifugó a 15,000 g por 10 minutos. El sobrenadante fue recuperado y colocado en un tubo nuevo y se procedió a realizar la precipitación del DNA con etanol al 96% dejando incubando por 12 horas a -20°C. Se centrifugó para formar el pellet de DNA y se realizaron 2 lavados con etanol al 70%. Finalmente, el DNA se resuspendió en 50 µL de Tris-HCl 10 mM pH 8.

2.3.2 Taxonomía molecular de mosquitos por PCR punto final

Se realizó la identificación de los mosquitos *Aedes*, *Anopheles* y *Culex*, utilizando dos oligonucleóticos (Mosquito-Fwd: 5'-TgT-gAA-CTg-CAg-gAC-ACAT-3' y Mosquito-Rev: 5'-TAT-gCT-TAA-ATT-CAg-ggg-gT -3') diseñados por Mewara *et. al.* que generan amplicones de 300 bp para *Ae. aegypti* y *Ae. albopictus*, 500 bp para *Anopheles* y 400 bp para *Culex*³⁴. Se mapearon dichos oligonucleótidos hacia

alineamientos generados localmente con el fin de validar el tamaño de los amplicones reportados. Los alineamientos fueron generados empleando 10 secuencias de cada una de las especies de mosquitos más abundantes en México según reportes previos^{35, 36}. Las especies incluidas fueron: *Ae. aegypti*, *Ae. Albopictus*, *Anopheles albimanus*, *An. pseudopunctipennis*, *An. punctimacula*, *An. darlingi* y *An. apicimacula* al igual que *Culex. pipiens*, *Cx. quiquefasciatus*, *Cx. coronator* y *Cx. nigripalpus*. Las secuencias fueron obtenidas de la base de datos GenBank de NCBI. Tras el diseño de nuevos oligonucleótidos (ver sección de resultados) los componentes y condiciones de PCR optimizadas se mencionan a continuación. Se mezclaron 1.25 µL de buffer 10X, 0.625 µL de MgCl₂ 50 mM, 0.25 µL de dNTPs 10 mM, 0.375 µL de cada primer a una concentración 10µM (Mosquito-Fwd, *Aedes*-Rev, *Culex*-Rev y Mosquito-Rev), 0.1 µL de Taq Polimerasa (Vivantis Technologies Sdn. Bhd. Malaysia) y 7.775 µL de dH₂O para completar un volumen de reacción de 12.5 µL. Las temperaturas y condiciones de amplificación fueron las siguientes: una desnaturalización inicial a 94° C por 2 minutos, 30 s a 94° C, 40 s a 50° C y 45 s a 72° C por 30 ciclos y finalmente una extensión final por 5 minutos a 72° C. Los productos de PCR se corrieron en un gel de agarosa al 3% durante 90 min a 90 VDC (3.6 V/cm).

2.3.3 Extracción RNA viral a partir de tarjetas FTA

Se realizaron algunas modificaciones al protocolo previamente publicado por Sakai T. *et al.*³⁷. Las tarjetas fueron colocadas en microtubos de 1.5 mL y posteriormente se les agregó 500 µL de buffer TE 10:1 a cada una y se mezclaron por vortex. Los microtubos se perforaron por la parte inferior y se colocaron dentro de un tubo de ensayo. Posteriormente, se centrifugaron a 3,000 g por 30 min y se recuperó la elución. Para la extracción de vRNA se tomaron 200 µL de elución y se colocaron en un microtubo nuevo seguidos de 1 mL de TRIzol (TRIzol Thermo Fisher Scientific Inc. Waltham, Massachusetts USA), esto se mezcló por pipeteo y el resto de la elución se almacenó a -80° C. A continuación, se agregaron 200 µL de cloroformo y se mezcló por vortex para después incubar 5 min a temperatura ambiente. Las muestras se centrifugaron a 15,600 g por 5 min y se recuperó la fase acuosa (superior) en un

microtubo nuevo al cual se le agregaron 350 µL de isopropanol al 100% para precipitar el vRNA durante 12 hrs a -20°C. Se centrifugaron las muestras a 15,600 g durante 5 minutos y se realizó un lavado con etanol al 70% con agua DEPC-tratada para finalmente resuspender el RNA en 50 µL de agua DEPC-tratada. Las muestras fueron almacenadas a -80° C hasta su uso posterior.

2.3.4 Detección de RNA viral

La detección de RNA de DENV, ZIKV y CHIKV se realizó por PCR punto final de acuerdo a los protocolos localmente optimizados y disponibles en línea (http://www.genomica.uaslp.mx/Protocolos/Exot_DENV.pdf, http://www.genomica.uaslp.mx/Protocolos/Exot_DENV1_4.pdf y http://www.genomica.uaslp.mx/Protocolos/Exot_ZIKA.pdf).

2.3.5 Evaluación de preservación de RNA viral

Para evaluar la preservación del vRNA en las tarjetas FTA con miel se utilizó el virus de la rabia (RABV), debido a su similitud con DENV, ZIKV y CHIKV, ya que cuenta con un genoma de RNA de cadena sencilla, pero en sentido negativo. Se agregaron 10 µL de vacuna de la rabia (vacuna de virus inactivado) marca Defensor 1[®] (Defensor 1[®], Zoetis Services LLC, Parsippany, New Jersey USA) a cada tarjeta FTA previamente impregnada con miel. Veinte tarjetas así preparadas se colocaron en *sistemas de alimentación con tarjetas FTA* dentro de una incubadora bacteriológica a +40° C durante 15 días. Cuatro tarjetas fueron tomadas cada día en los días 0, +1, +3, +7 y +15 y turnadas para extracción de vRNA mediante TRIzol y detectando el vRNA por medio de qRT-PCR de acuerdo al protocolo localmente optimizado (http://www.genomica.uaslp.mx/Protocolos/Exot_RABV.pdf).

2.4 Estudio piloto en San Luis Potosí

2.4.1 Sitio de muestreo

El diseño final y optimizado de trampas Yoy-10 de 10 litros de capacidad fue evaluado en un estudio de campo suburbano en Área Natural Protegida Parque Urbano “Paseo de la Presa” (22°08'53.5"N 101°02'36.8"W) durante el mes de Julio

del 2019 (**Figura 1**, panel E). No fue posible realizar el estudio piloto en la comunidad de Tocoay, municipio de San Antonio, SLP de la Huasteca Potosina debido a retrasos inusuales en la temporada de lluvias y las consecuencias ecológicas de los incendios ocurridos en lugares aledaños.

2.4.2 Diseño experimental

Las capturas realizadas fueron por conveniencia, colocando de 6 a 10 trampas por día de captura. Las trampas se colocaron a las 17:00 h y se recogieron a las 8:00 h del día siguiente dando un total de 15 horas de captura y a cada trampa se le suministraba CO₂ con un generador que contenía 1.5 kg de hielo seco. Cabe mencionar que para el contero de mosquitos se pesaron 100, 150, 200 y 300 mosquitos y se calculó su peso promedio. Los mosquitos recolectados durante este estudio fueron utilizados para evaluar los BCM y realizar pruebas taxonómicas para conocer la abundancia de los diferentes géneros y especies de mosquitos en la zona.

2.4.3 Evaluación de la tasa de alimentación en BCM

Una vez capturados los mosquitos, fueron transferidos a los BCM. Se depositaron las capturas de dos trampas en cada BCM y se evaluó la supervivencia de los mosquitos durante 10 días al igual que la tasa de alimentación de los mosquitos a las 24, 48 y 72 horas.

2.4.4 Análisis estadístico

Se utilizó el programa GraphPad Prism (version 6.00 para Mac OS X, GraphPad Software, La Jolla California USA) para las diferentes pruebas estadísticas realizadas. Para los análisis donde se compararon dos grupos se realizó una prueba t de Student cuando los datos presentaban normalidad y la prueba de U de Mann Whitney para los datos con distribución no normal. Aquellos análisis que implicaban la comparación de más de dos grupos se realizaron por medio de una ANOVA de una vía para datos normales y la prueba de Kruskal-Wallis para datos que no presentaban normalidad.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tras la evaluación de las cuatro trampas (Yoy-1.5, 2, 5 y 10) se descartó de manera inmediata la Yoy-1.5 por fracaso total. De las restantes, las trampas con mejor desempeño fueron Yoy-5 y Yoy-10 ya que estas capturaron mayor número de mosquitos, mediana de 29 (95%CI, 7 - 55) versus 31 (95% CI, 10 - 155), respectivamente (**Figura 3**, panel A). El porcentaje de alimentación demostró ser superior en la Yoy-5 con una mediana de 61% (95% CI 53-92) y Yoy-10 56% (95% CI, 42-89) en comparación con la SMACK y Yoy-2 (**Figura 3**, panel B). En una segunda evaluación competitiva con duración de 20 días se comparó el desempeño en capturas y tasa de alimentación de las trampas Yoy-5 y Yoy-10. Las trampas se colocaron bajo las mismas condiciones que el estudio anterior. A partir de estas pruebas se seleccionó la trampa Yoy-10 para los futuros ensayos piloto en campo ya que esta capturó mayor cantidad de mosquitos (media de 388 ± 333 mosquitos) en comparación con Yoy-5 (144 ± 100 mosquitos), $p = 0.00392$ (**Figura 4**, panel A). A pesar de que la tasa de alimentación fue mayor en Yoy-5 (media de $55 \pm 9\%$) que Yoy-10 ($43 \pm 10\%$) (**Figura 4**, panel C), el número total de mosquitos que se alimentaron de la tarjeta FTA fue superior en Yoy-10 (**Figura 4**, panel D). Este hallazgo es de gran relevancia ya que a mayor tasa de alimentación aumentan las probabilidades de detección de DENV, ZIKV y CHIKV en la tarjeta FTA.

El tipo de generador a utilizar durante las capturas se seleccionó tomando en cuenta el gasto, costo y la capacidad para atraer mosquitos u otro tipo de insecto que no fueran de nuestro interés. Los generadores de levadura obtuvieron un gasto promedio de 140.6 mL de CO₂/min y un flujo máximo 163.3 mL de CO₂/min. Además de que el gasto se encuentra por debajo del flujo recomendado es importante mencionar que durante las capturas los generadores de levadura atraían insectos que no eran de nuestro interés (insectos “no-blanco”), en particular de *Drosophila*. Los generadores de hielo seco obtuvieron un flujo teórico de 914 mL de CO₂/min (calculado por sublimación estimada en base a peso y condiciones ATM estándar) y un flujo experimental de 800 mL de CO₂/min. El flujo obtenido está muy por encima

del recomendado. Adicionalmente, cabe mencionar que dichos generadores de hielo seco son compactos, de transporte sencillo, rápida instalación y atraen únicamente a mosquitos de interés. El uso de cilindros de CO₂ comprimido se descartó en evaluaciones tempranas por su costo, riesgo y dificultades técnicas para el trabajo en campo.

Se decidió utilizar miel al 100% tras evaluar distintos porcentajes para la impregnación de tarjetas FTA. Preparaciones con menor porcentaje de miel rápidamente se colonizaban por hongos. El tiempo necesario para que las tarjetas absorbieran la misma cantidad de miel fue de 3 horas ya que a partir de este momento no se presentaba una diferencia significativa entre el peso de tarjetas externas (media 957.1 ± 46.7 mg) e internas (922.3 ± 38.5 mg), $p = 0.0521$, ver **Figura 5**. Debido a que se observó una tendencia a disminuir aún más la diferencia entre el peso de las tarjetas externas e internas (950.3 ± 48.4 y 924.7 ± 28.0 respectivamente, $p = 0.1353$) a las 6 horas se decidió colocarlas bajo presión durante toda la noche. Adicionalmente, se descubrió que el colorante alimenticio verde empleado para impregnar las tarjetas FTA resultó ser el más fácil de identificar visualmente en el abdomen de los mosquitos, incluso macroscópicamente. Como los mosquitos se alimentan de las tarjetas dentro de las trampas, es crucial mantener la humedad de las tarjetas empleando el *sistema de alimentación con tarjetas FTA* optimizado, el cual disminuye la cartonización y endurecimiento de las tarjetas por desecado.

Utilizando la estrategia de extracción de DNA de mosquito de PCI se extrajeron 4.54 ± 1.64 µg de DNA (90.87 ± 32.9 ng/µL) con un índice $A^{260/280}$ de 1.8 ± 0.10 y $A^{260/230}$ de 1.5 ± 0.2 , además de que todas las muestras están íntegras. Las extracciones por Dråbek logaron una menor cantidad de DNA siendo esta de 1.47 ± 0.47 µg (29.39 ± 9.32 ng/µL) y con índices $A^{260/280}$ de 1.82 ± 0.15 y $A^{260/230}$ de 12.13 ± 0.20 . Se logró conservar la integridad del DNA en el 96% de las muestras evaluadas. A pesar de extraer menor cantidad de DNA por Dråbek el método cuenta con las ventajas de ser

más económico y prescindir de reactivos altamente tóxicos como fenol y cloroformo o de mayor costo como los de grado molecular (proteínasa K).

Al mapear los oligonucleótidos reportados por Mewara et al (Mosquito-Fwd y Mosquito-Rev) observamos que no era posible diferenciar entre los géneros de mosquitos ya que las especies de *Anopheles* generaban bandas de 400 a 500 bp que podían ser confundidas por las bandas resultantes de *Culex* de 450 bp. Así mismo, los mosquitos *Ae. albopictus* generaban amplicones de 520 bp, fácilmente confundibles con *Anopheles*. Debido a ello, se diseñaron dos oligonucleótidos adicionales que generaran bandas de 125 bp para *Aedes* y 200 bp para *Culex*. Dichos oligonucleótidos fueron: *Aedes*-Rev 5'-gAg-Agg-gAg-gCA-CAC-gTA-TA-3' y *Culex*-Rev 5'-gTC-TTg-AAT-gTT-TTg-CCA-gC-3', ambas secuencias corresponden al reverso complementario. De esta manera, los mosquitos fueron identificados como *Aedes*, *Anopheles* o *Culex* por medio de una SSP-PCR multiplex utilizando los primers Mosquito-Fwd, *Aedes*-Rev, *Culex*-Rev y Mosquito-Rev. Las bandas generadas fueron las siguientes: una banda única de ~500 bp para *Anopheles*, dos bandas de ~330 bp y ~125 bp para *Ae. aegypti*, ~520 bp y ~125 bp para *Ae. albopictus* y dos bandas de ~200 bp y ~400 bp para *Culex*.

Se compararon los resultados de taxonomía molecular generados a través de PCR multiplex (con todos los primers mezclados) con aquellos generados en singleplex (empleando pares de primers por separado) encontrando una concordancia completa en los resultados para todas las muestras analizadas. En base a ello, se procedió a realizar la asignación taxonómica de mosquitos a través del acercamiento multiplex. Las bandas de PCR de los distintos géneros de mosquitos fueron fácilmente diferenciables unas de otras (**Figura 6**). *Ae. aegypti* genera dos bandas de ~350 bp y ~125 bp, *Anopheles* únicamente genera un amplicón de ~450 bp, mientras que *Culex* produce dos bandas de ~400 bp y ~200 bp. No se logró detectar *Ae. albopictus*, lo cual no sorprende dada la altitud a la que se encuentra San Luis Potosí. Se confía en poder identificar su presencia cuando el estudio involucre el muestreo de regiones Huastecas de menor altitud.

En la evaluación de preservación de vRNA, se logró detectar el vRNA de RABV en el 100% de las tarjetas (4/4) a los días 0 y +1, en 75% de las tarjetas (3/4) tomadas al día +3 de incubación, el 50% de las tarjetas (2/4) al día +7 y en únicamente el 25% de las tarjetas (1/4) correspondientes al día +15. Este resultado es de suma importancia ya que demuestra la capacidad del sistema para preservar el vRNA de un virus similar al de DENV, ZIKV y CHIKV por hasta 15 días a condiciones de temperatura y humedad extremas (40° C y humedad relativa >50%). Esto apoya la aplicabilidad del sistema sugerido para las capturas de mosquitos en zonas de la Huasteca Potosina. Además, valida la posibilidad de referir muestras por transporte terrestre con una red fría simple y poco demandante (en cuanto a estabilidad de temperaturas).

A pesar de que existen preservadores de RNA comerciales capaces de proteger este tipo de muestras por horas e incluso semanas a temperatura ambiente como el GenTegra-RNA[®], RNA-shell[®], RNAlater[®], estos suelen ser costosos y difíciles de obtener y mantener. Nuestros resultados demuestran cómo este acercamiento sencillo y de bajo costo logra resultados similares con respecto a la capacidad de preservación de vRNA. El conservar la humedad en las tarjetas es necesario ya que además de ayudar a extraer de mejor manera el vRNA, permite que los mosquitos se estén alimentando de ella, si la tarjeta se llegara a cartonizar por efecto de la miel, los mosquitos no podrían introducir su probóscide y por ende no depositarían el virus en ellas.

El peso promedio de los mosquitos fue de 0.99 ± 0.07 mg, por lo que el peso total de las capturas por trampa se dividió entre 0.99 para conocer el número aproximado de mosquitos capturados. Durante el estudio en campo suburbano en Área Natural Protegida Parque Urbano "Paseo de la Presa" se realizó un cambio en el diseño de la trampa Yoy-10. Sin embargo, este no afectó el desempeño de esta, ya que durante las capturas realizadas las trampas capturaron una mediana de 440 mosquitos (95% CI, 314 - 840). Cabe mencionar que las modificaciones realizadas

en el diseño hacen que su transporte, colocación y recolección se realice de manera más rápida y sencilla exponiendo a los operadores a menos agresiones por insectos. Se realizaron capturas los días 28 de junio colocando 9 trampas, 01, 02 y 08 de julio colocando 6 trampas y el 10 de julio colocando 10 trampas. El número de capturas totales por día fue de 2,737, 7,908, 2,828, 7,359 y 5,594 mosquitos respectivamente, dando un total acumulado de 26,426 mosquitos en cinco días de captura.

Una vez transferidos los mosquitos a los BMC, se observó que casi todos los mosquitos sobrevivían al menos 3 días en la jaula y para el día +10 alrededor del 10% de los mosquitos continuaban vivos. La tasa de alimentación fue de 45.2% (864/1913 mosquitos alimentados) a las 24 horas, de 48.4% (1,177/2,431 mosquitos alimentado) a las 48 horas y de 53.3 % (666/1,250 mosquitos alimentados) a las 72 horas. Existe un aumento significativo en la tasa de alimentación al comparar las 24 h contra las 48 h ($p = 0.035$) al igual que al comparar las 48 h contra las 72 horas ($p = 0.005$) y al comparar las 24 h versus las 72 h ($p < 0.001$). Este hallazgo no solo apoya la noción de que la incubación de mosquitos en cautiverio empleando el BMC nos permitirá incrementar las posibilidades de detección arboviral, sino que supone un sistema de transporte seguro de mosquitos desde su sitio de captura hasta el laboratorio donde serán procesados, y más importante aún, podrán ser utilizados en estudios de infecciones experimentales de mosquitos con arbovirus en una plataforma de contención biológica compacta, sencilla y económica. Esto supone un logro no esperado del proyecto propuesto.

A partir de los mosquitos capturados se realizó la identificación de los géneros *Aedes*, *Anopheles* y *Culex* en 100 de los ellos con una eficiencia de la técnica del 74%. De los 74 mosquitos, 41 (55%) resultaron ser *Aedes*, 22 (30%) *Anopheles* y 11 (15%) *Culex*. El resto de los mosquitos que no se logró identificar pudo deberse a una baja concentración de DNA en esa muestra o bien a que se trataba de un género diferente no identificable por esta técnica.

CONCLUSIONES

Se realizó el diseño de una trampa de bajo costo, fácil de amar y de bajo mantenimiento que nos permite capturar mayor cantidad de mosquitos en comparación con el estándar industrial de la SMACK. Las capturas promedio registradas en el sitio suburbano fue de 440 mosquitos por trampa, por noche de captura, la mitad de las capturas registradas por la SMACK en un ambiente extremadamente infestado por mosquitos en el oriente de Australia.

Adicional a esto, se realizó el diseño de un sistema de confinamiento de bioseguridad de mosquitos de bajo costo y fácil ensamblaje que aumenta las probabilidades de detección de arbovirus en tarjetas FTA al aumentar la tasa de alimentación de los mosquitos. Además, al ser completamente hermético, puede utilizarse para el transporte de mosquitos capturados, y al cumplir con los requisitos de bioseguridad necesarios podrían ser utilizados para ensayos de infecciones experimentales de mosquitos con arbovirus y así evaluar la propagación de estos.

La miel utilizada para impregnar las tarjetas FTA funciona como una fuente atractiva de alimento para los mosquitos ya que ~45% de ellos se alimentaron durante las primeras 24 horas. Esto es de gran relevancia debido a que incrementa en gran medida la probabilidad de detección de vRNA en las tarjetas. Así mismo, la alta capacidad de preservación de ácidos nucleicos observada en las tarjetas FTA a temperaturas de 40°C, representa una ventaja en el diseño de la trampa ya que se trata de un sistema simple, económico y que prescinde de una red fría para el transporte de muestras de RNA.

Se desarrolló y optimizó una técnica de extracción de DNA a partir de mosquitos que evita el uso de reactivos tóxicos y de bajo costo. Así mismo, se desarrolló un método molecular de identificación taxonómica de mosquitos por SSP-PCR multiplex que distingue entre los géneros *Aedes*, *Anopheles* y *Culex*, tres de los mosquitos de mayor relevancia a nivel mundial debido a su capacidad de transmisión de diferentes

enfermedades arbovirales las cuales representan una amenaza de salud pública a nivel mundial.

Las pruebas en campo demostraron que el estudio piloto por realizar en la Huasteca Potosina es altamente factible debido a la eficiencia de capturas de las trampas Yoy-10 y los bajos costos. El costo de producción de cada trampa fue de \$52.10 con un costo de operación de \$66.9 por trampa por noche de captura.

BIBLIOGRAFÍA

1. McArthur DB. Emerging Infectious Diseases. *Nurs Clin North Am.* Jun 2019;54(2):297-311.
2. Mehand MS, Al-Shorbaji F, Millett P, Murgue B. The WHO R&D Blueprint: 2018 review of emerging infectious diseases requiring urgent research and development efforts. *Antiviral Res.* Nov 2018;159:63-67.
3. Roberts CC, Maslow JN. Assay Challenges for Emerging Infectious Diseases: The Zika Experience. *Vaccines (Basel).* Oct 2 2018;6(4).
4. Liu ZY, Shi WF, Qin CF. The evolution of Zika virus from Asia to the Americas. *Nat Rev Microbiol.* Mar 2019;17(3):131-139.
5. Ohst C, Saschenbrecker S, Stiba K, et al. Reliable Serological Testing for the Diagnosis of Emerging Infectious Diseases. *Adv Exp Med Biol.* 2018;1062:19-43.
6. Guarner J, Hale GL. Four human diseases with significant public health impact caused by mosquito-borne flaviviruses: West Nile, Zika, dengue and yellow fever. *Semin Diagn Pathol.* May 2019;36(3):170-176.
7. Laserna A, Barahona-Correa J, Baquero L, Castaneda-Cardona C, Rosselli D. Economic impact of dengue fever in Latin America and the Caribbean: a systematic review. *Rev Panam Salud Publica.* 2018;42:e111.
8. Mukherjee D, Das S, Begum F, Mal S, Ray U. The Mosquito Immune System and the Life of Dengue Virus: What We Know and Do Not Know. *Pathogens.* Jun 13 2019;8(2).
9. Khaiboullina SF, Ribeiro FM, Uppal T, Martynova EV, Rizvanov AA, Verma SC. Zika Virus Transmission Through Blood Tissue Barriers. *Front Microbiol.* 2019;10:1465.
10. Wenham C, Arevalo A, Coast E, et al. Zika, abortion and health emergencies: a review of contemporary debates. *Global Health.* Jul 24 2019;15(1):49.
11. Lima MES, Bachur TPR, Aragao GF. Guillain-Barre syndrome and its correlation with dengue, Zika and chikungunya viruses infection based on a literature review of reported cases in Brazil. *Acta Trop.* Sep 2019;197:105064.
12. Ioos S, Mallet HP, Leparac Goffart I, Gauthier V, Cardoso T, Herida M. Current Zika virus epidemiology and recent epidemics. *Med Mal Infect.* Jul 2014;44(7):302-307.
13. Patterson J, Sammon M, Garg M. Dengue, Zika and Chikungunya: Emerging Arboviruses in the New World. *West J Emerg Med.* Nov 2016;17(6):671-679.
14. Gonzalez-Sanchez JA, Ramirez-Arroyo GF. Chikungunya Virus: History, Geographic Distribution, Clinical Picture, and Treatment. *P R Health Sci J.* Dec 2018;37(4):187-194.
15. Mascarenhas M, Garasia S, Berthiaume P, et al. A scoping review of published literature on chikungunya virus. *PLoS One.* 2018;13(11):e0207554.
16. Rezza G, Weaver SC. Chikungunya as a paradigm for emerging viral diseases: Evaluating disease impact and hurdles to vaccine development. *PLoS Negl Trop Dis.* Jan 2019;13(1):e0006919.
17. Weaver SC, Lecuit M. Chikungunya virus and the global spread of a mosquito-borne disease. *N Engl J Med.* Mar 26 2015;372(13):1231-1239.

18. Alonso-Palomares LA, Moreno-Garcia M, Lanz-Mendoza H, Salazar MI. Molecular Basis for Arbovirus Transmission by *Aedes aegypti* Mosquitoes. *Intervirology*. 2018;61(6):255-264.
19. Huang YS, Higgs S, Vanlandingham DL. Arbovirus-Mosquito Vector-Host Interactions and the Impact on Transmission and Disease Pathogenesis of Arboviruses. *Front Microbiol*. 2019;10:22.
20. Wu P, Yu X, Wang P, Cheng G. Arbovirus lifecycle in mosquito: acquisition, propagation and transmission. *Expert Rev Mol Med*. Mar 13 2019;21:e1.
21. Johnson BJ, Kerlin T, Hall-Mendelin S, et al. Development and field evaluation of the sentinel mosquito arbovirus capture kit (SMACK). *Parasit Vectors*. Oct 6 2015;8:509.
22. Hall-Mendelin S, Ritchie SA, Johansen CA, et al. Exploiting mosquito sugar feeding to detect mosquito-borne pathogens. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Jun 22 2010;107(25):11255-11259.
23. Ritchie SA, Cortis G, Paton C, et al. A simple non-powered passive trap for the collection of mosquitoes for arbovirus surveillance. *J Med Entomol*. Jan 2013;50(1):185-194.
24. Kurucz N, Minney-Smith CA, Johansen CA. Arbovirus surveillance using FTA(TM) cards in modified CO₂ -baited encephalitis virus surveillance traps in the Northern Territory, Australia. *J Vector Ecol*. Jun 2019;44(1):187-194.
25. van den Hurk AF, Hall-Mendelin S, Townsend M, et al. Applications of a sugar-based surveillance system to track arboviruses in wild mosquito populations. *Vector Borne Zoonotic Dis*. Jan 2014;14(1):66-73.
26. Smallegange RC, Schmied WH, van Roey KJ, et al. Sugar-fermenting yeast as an organic source of carbon dioxide to attract the malaria mosquito *Anopheles gambiae*. *Malar J*. Oct 25 2010;9:292.
27. Aldridge RL, Britch SC, Allan SA, et al. Comparison of Volatiles and Mosquito Capture Efficacy For Three Carbohydrate Sources In A Yeast-Fermentation CO₂ Generator. *J Am Mosq Control Assoc*. Dec 2016;32(4):282-291.
28. Trajer AJ. Which mosquitoes (Diptera: Culicidae) are candidates for DNA extraction in forensic practice? *J Forensic Leg Med*. Aug 2018;58:183-191.
29. Panda BB, Pradhan N, Hazra RK. Comparative analysis of three methods from dried blood spots for expeditious DNA extraction from mosquitoes; suitable for PCR based techniques. *Mol Biol Rep*. Feb 2019;46(1):151-160.
30. L MH-T, V AB, N IN, et al. DNA barcoding of British mosquitoes (Diptera, Culicidae) to support species identification, discovery of cryptic genetic diversity and monitoring invasive species. *Zookeys*. 2019;832:57-76.
31. Garcia-Sepulveda CA, Carrillo-Acuna E, Guerra-Palomares SE, Barriga-Moreno M. Maxiprep genomic DNA extractions for molecular epidemiology studies and biorepositories. *Mol Biol Rep*. Apr 2010;37(4):1883-1890.
32. Drabek J, Petrek M. A sugar, laundry detergent, and salt method for extraction of deoxyribonucleic acid from blood. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*. Dec 2002;146(2):37-39.
33. Nasiri H, Forouzandeh M, Rasaei MJ, Rahbarizadeh F. Modified salting-out method: high-yield, high-quality genomic DNA extraction from whole blood using laundry detergent. *J Clin Lab Anal*. 2005;19(6):229-232.

34. Mewara A, Sharma M, Kaura T, Zaman K, Yadav R, Sehgal R. Rapid identification of medically important mosquitoes by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Parasit Vectors*. May 2 2018;11(1):281.
35. Bond JG, Casas-Martinez M, Quiroz-Martinez H, et al. Diversity of mosquitoes and the aquatic insects associated with their oviposition sites along the Pacific coast of Mexico. *Parasit Vectors*. Jan 22 2014;7:41.
36. Villarreal-Trevino C, Penilla-Navarro RP, Vazquez-Martinez MG, et al. Larval habitat characterization of *Anopheles darlingi* from its northernmost geographical distribution in Chiapas, Mexico. *Malar J*. Dec 22 2015;14:517.
37. Sakai T, Ishii A, Segawa T, Takagi Y, Kobayashi Y, Itou T. Establishing conditions for the storage and elution of rabies virus RNA using FTA((R)) cards. *J Vet Med Sci*. Apr 2015;77(4):461-465.

PIES DE FIGURA

Figura 1. Diseño de trampas Yoy. Trampas Yoy (**A, B, C y D**) generadas a partir de botellas recicladas de 1.5, 2, 5 y 10 litros. Cuentan con un agujero en el cual se colocó un frasco de 40 mL que contenía la tarjeta FTA. Así mismo se colocó un tubo cónico relleno de esponja con agua para control de humedad y se cortó la parte inferior de las botellas para realizar un embudo de entrada a partir de una malla mosquitera. Todas estas trampas se realizaron en base a la SMACK. El panel **D** muestra el diseño final de la trampa Yoy-10 unido a su generador de CO₂.

Figura 2. Sistemas de confinamiento de bioseguridad de mosquitos (BMC). Los BMC se realizaron a partir de una caja de plástico, contaban con dos agujeros para colocar tarjetas FTA en la parte superior, además de que estos también se utilizaron para la transferencia de mosquitos, un puerto de ventilación de 10 x 10 cm cubierto con malla mosquitera, anillos de plástico en las paredes para aumentar la superficie de descanso dentro del BMC y una microfibra impregnada con agua para controlar la humedad. Durante las incubaciones de mosquitos estas jaulas se colocaron dentro de un cuarto con temperatura controlada de 26° C.

Figura 3. Comparación entre el número de mosquitos capturados en una noche (A) y tasa de alimentación (B) entre las trampas SMACK, Yoy-2, Yoy-5 y Yoy-10. Las trampas Yoy-5 y Yoy-10 capturaron mayor número de mosquitos en comparación con las demás trampas evaluadas, así como un mayor porcentaje de mosquitos alimentados. Los datos se analizaron por una prueba de Kruskal-Wallis y se presentan como mediana (95% CI).

Figura 4. Comparación entre Yoy-5 y Yoy-10. Número medio \pm SD de mosquitos capturas en una noche **(A)** y número de mosquitos por litro capturados **(B)**. La tasa de alimentación (Media \pm SD) fue mayor en Yoy-5 **(C)**; sin embargo, el número total de mosquitos alimentados **(D)** dentro de la trampa (media \pm SD) fue mayor en Yoy-10.

Figura 5. Evaluación de la impregnación de las tarjetas FTA con miel. Las tarjetas FTA se depositaron bajo presión y se pesaron pasadas 1, 3 y 6 horas. Se observó que el peso de las tarjetas externas e internas no era estadísticamente diferente pasadas 3 horas, es decir habían absorbido la miel de manera homogénea. A pesar de ello se decidió colocar las tarjetas bajo presión durante por lo menos 6 horas y disminuir aún más la diferencia entre ellas.

Figura 6. Taxonomía molecular de mosquitos. Se presentan los amplicones resultantes de una PCR multiplex (Mx) y singleplex (M, Ae y Cx) para cada tipo de mosquito a identificar. Al realizar las PCR multiplex se observan dos bandas de \sim 400 bp y \sim 125 bp para *Aedes aegypti*, una banda de \sim 450 bp para *Anopheles* y dos bandas de \sim 400 bp y \sim 200 bp para *Culex*. Al realizar las PCR por singleplex se observa en *Aedes* que la banda de mayor intensidad se presenta en la muestra que contiene los primers Mosquito-Fwd y *Aedes*-Rev (Ae), en el caso de *Anopheles* únicamente amplifica la muestra que contiene los primers Mosquito-Fwd y Mosquito-R (M), ya que Ae-R y Cx-R no son específicos para estos mosquitos, y para *Culex* existe amplificación en las muestras que contienen los primers Mosquito-F y Mosquito-R (M) y Mosquito-F y Cx-R (Cx).

FIGURAS

Figura 1



Figura 2



Figura 3

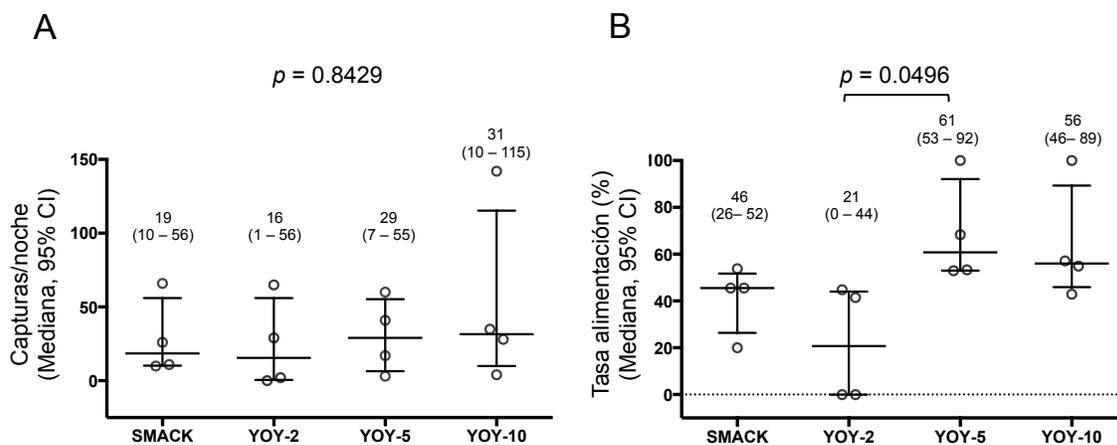


Figura 4

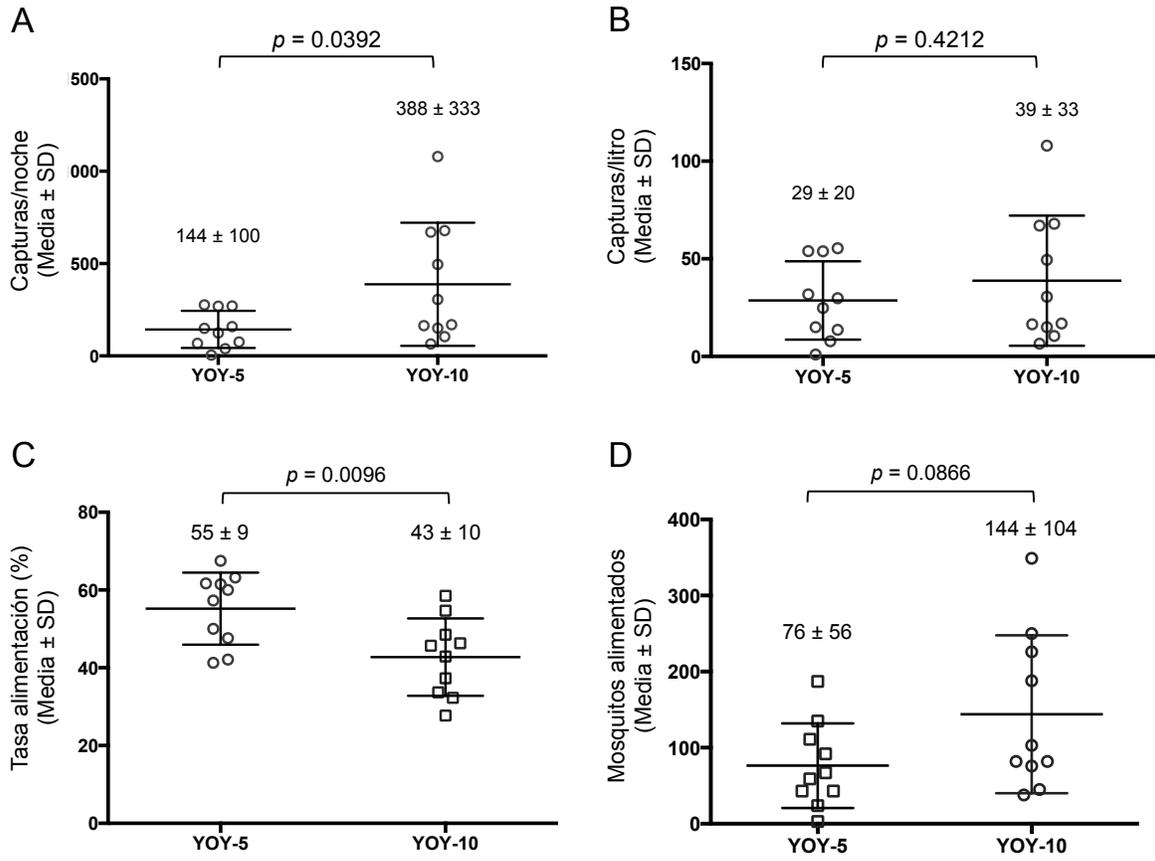


Figura 5

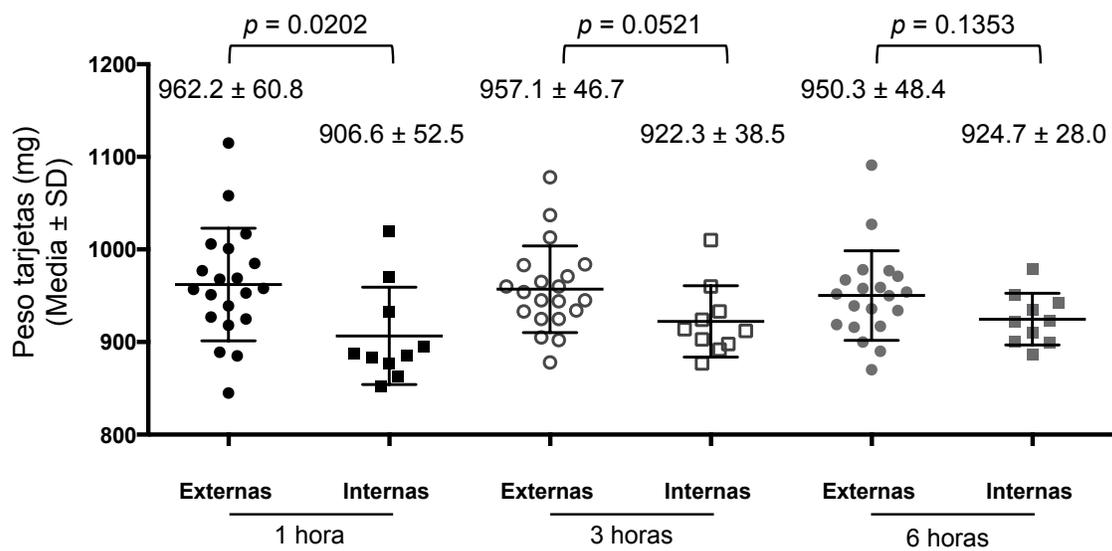


Figura 6

