



GUIA DE COLECTA ENTOMOLÓGICA

CONACYT

Proyecto Salud S008-2009-01-114902

**AISLAMIENTO Y SEROTIPIFICACION DE VIRUS DEL DENGUE EN MOSQUITOS
DEL GENERO AEDES PARA LA VIGILANCIA EPIDEMIOLOGICA DE LA ENFERMEDAD**





El propósito de la vigilancia entomológica del dengue es establecer la capacidad de análisis, toma de decisiones, gestión, seguimiento y evaluación de los programas operativos de control de vectores, utilizando diferentes herramientas de información que se generan con base en evidencia operativa, de diagnóstico y/o investigación. Para ello, se aborda un conjunto de acciones que proveen información necesaria para la implementación de acciones destinadas al control o eliminación de infestaciones por vectores en forma temporal o permanente:

- Identificación áreas de transmisión pasiva y activa.
- Identificación taxonómica las especies y distribución de los vectores en las áreas de transmisión.
- Determinación del grado de infestación
- Identificación de factores de riesgo asociados a las áreas de transmisión de la enfermedad.
- Monitoreo del grado de infección de los vectores.
- Eliminación o control del grado de infestación vectorial
- Verificación del papel de los vectores involucrados en los brotes.
- Evaluación de las medidas de control de los vectores costo-efectividad
- Evaluación de la residualidad de las acciones de control químicas domiciliarias.
- Monitoreo de la susceptibilidad de los vectores a los insecticidas empleados en el control, en los sitios donde hay transmisión temporal o permanente.

Una de las necesidades actuales de cualquier programa de dengue en el mundo y también en México, es el desarrollo de la vigilancia anticipatoria (proactiva) para aumentar la capacidad de predecir la transmisión y proporcionar una guía a la implementación oportuna de las medidas de control.

En este protocolo se emplearon dos métodos de detección uno de biología molecular y otro de serológica: RT-PCR fourplex en tiempo real y detección de antígeno NS1 por ELISA.

Por los resultados obtenidos del proyecto en la detección eficaz de virus dengue en el vector, el hallazgo de transmisión transovárica del virus dengue en *Aedes aegypti*, así como la detección anticipada de serotipos de dengue en mosquitos que no se han reportado en humanos, son positivamente promisorios para su implementación dentro de la vigilancia Entomo-Virológica de dengue en México.



COLECTAS ENTOMOLÓGICAS

En los muestreos se ubicaron localidades con casos recientes de dengue, generalmente con base en notificación por estudio confirmatorio de laboratorio de una semana anterior al muestreo entomológico. También se realizaron colectas en sitios sin casos recientes por dengue para fines comparativos con similares condiciones ambientales y de vivienda humana con presencia de vectores de dengue (*Aedes aegypti* y/o *Aedes albopictus*).

Las colectas fueron establecidas de acuerdo con el protocolo empleado rutinariamente por los Servicios de Salud de Morelos y de acuerdo a la NOM-032-SSA2-2009 (DOF, 2010):

Ovitrampas

Se instalaron trampas de ovipostura con ciclos de 7 días en el peri-domicilio de las viviendas seleccionadas. Todos los huevos colectados en campo fueron cultivados en el Insectario hasta su etapa adulta de acuerdo al manual del laboratorio. Las muestras se etiquetaron con los datos de colecta y datos asociados a la vivienda para su posterior referencia.

Colecta de larvas y pupas

En las mismas casas se realizó la búsqueda activa de larvas y pupas de mosquito en todas las viviendas seleccionadas de acuerdo a los procedimientos convencionales (WHO, 2009; Manrique-Saide *et al.*, 2011). Brevemente, se llevaron a cabo inspecciones en el área peridoméstica de cada casa buscando contenedores con agua y a la vez positivos a estados inmaduros, tomando en cuenta la capacidad (volumen del recipiente) y material de manufactura (metal, plástico, etc.).

Todas las larvas y pupas de mosquitos de los contenedores positivos fueron colectadas y conservadas en tubos de plástico de 250 ml con la misma agua del contenedor (Fig.2) y posteriormente se transportaron (ejemplares vivos) al laboratorio para su cultivo en el Insectario del hasta su etapa adulta de acuerdo al manual del laboratorio. Las muestras se etiquetaron con los datos de colecta y datos asociados a la vivienda para su posterior referencia.



Fig. 2. Colecta de larvas y pupas en un criadero de mosquito.

Colecta de mosquitos adultos en campo

Se llevó a cabo la búsqueda activa de mosquitos adultos intra y en el peridomicilio de las casas con redes entomológica y aspiradores manuales y de motomochila (Fig. 3a). En todos los casos, los especímenes se colocaron inmediatamente en vasos de cartón encerado y se transportaron al laboratorio.

Los aspiradores portátiles de mochila (battery powered Modified CDC Backpack Aspirator Model 1412 John Whock Co.®) son un equipo eficaz (Fig. 3b), el cual es impulsado por una batería de 12 voltios, con la potencia para capturar mosquitos adultos que se encuentren entre 10-15 centímetros de la boca del contenedor de captura, sin dañar o deteriorar a los mosquitos. El tubo flexible permite el acceso a sitios complicados y difíciles. Los componentes usados en el armado del aspirador son de fácil acceso de adquirir.

Los operadores pueden trabajar de preferencia en pares, uno de ellos aspira metódicamente en los sitios donde es probable encontrar a los mosquitos reposando o en vuelo, mientras que el otro facilita el acceso moviendo mobiliario, ropa y otros artículos domésticos. Durante este esfuerzo el uso auxiliar de una red entomológica de mano para capturar los mosquitos puede facilitar la captura los mosquitos (Fig. 3c).

Los armarios, roperos de las áreas de dormitorios, detrás o entre la ropa colgada, son a menudo sitios muy productivos para la captura de los adultos en reposo. En viviendas con más de una habitación, es útil revisar todas las áreas. Concentrándose en dos o tres de este tipo de habitaciones por casa, un par de operadores puede tomar muestras de 10-15 casas en un turno. Como una alternativa al aspirador tipo mochila, algunos operadores han usado una modificación, la aspiradora manual. Estos equipos también tienen una succión suficientemente para capturar los mosquitos en vuelo de 10-15 centímetros de la boca del recipiente de captura.

Una vez capturados los mosquitos en vuelo o en reposo mediante la motomochila o con red entomológica, estos se toman con el aspirador y se colocan en vasos (Fig. 4a). Los vasos deben estar previamente preparados con tul muy fino, el cual se coloca al nivel de boca del vaso y se adhiere con ligas o cinta, para pasar los mosquitos capturados se toman con el aspirador y luego se colocan en el interior del vaso de cartón encerado, este se tapa con una pequeña torunda de algodón.

Se recomienda incluir entre 10 a 20 mosquitos vivos en los vasos (Fig. 4b). Estas muestras posteriormente se colocan en una caja de cartón y se tapan con una tela húmeda para posteriormente llevarlos al laboratorio, en el traslado es recomendable preparar una solución líquida de agua azucarada al 10% y colocarla sobre la tul de los vasos en pequeñas torundas de algodón para alimentar a los mosquitos y asegurar lo posible para que lleguen vivos. Si fuera el caso en que el traslado sea muy largo, por más de 10 horas, es recomendable preservar los mosquitos en nitrógeno líquido o en hielo seco en cadena fría a -4°C .



Figura 3. a) Equipo para la colecta de mosquitos adultos; b) Motomochila para la captura de mosquitos en viviendas; c) captura de mosquitos capturados con aspirador manual y red entomológica.



Figura 4. Captura de mosquitos vivos en vasos de cartón encerados.

IDENTIFICACIÓN TAXONÓMICA DE MOSQUITOS

Después del trabajo de campo en la recolección de las muestras, se trasladaron al Laboratorio, donde los ejemplares fueron mantenidos vivos para su estudio. Las larvas y pupas fueron cultivadas en el insectario y separadas por especie. Los adultos fueron separados por sexo y especie. En específico, las muestras con *Aedes aegypti* o *Aedes albopictus*, fueron conservadas en el ultracongelador a -70°C para su posterior análisis en el laboratorio de Arbovirus.

El proceso de identificación taxonómica fue basado en literatura especializada de mosquitos y por comparación con material de referencia de la Colección de Artrópodos con Importancia Médica (CAIM). Todos los ejemplares que no se procesaron para detección de virus fueron depositados en la colección entomológica (Fig. 5).

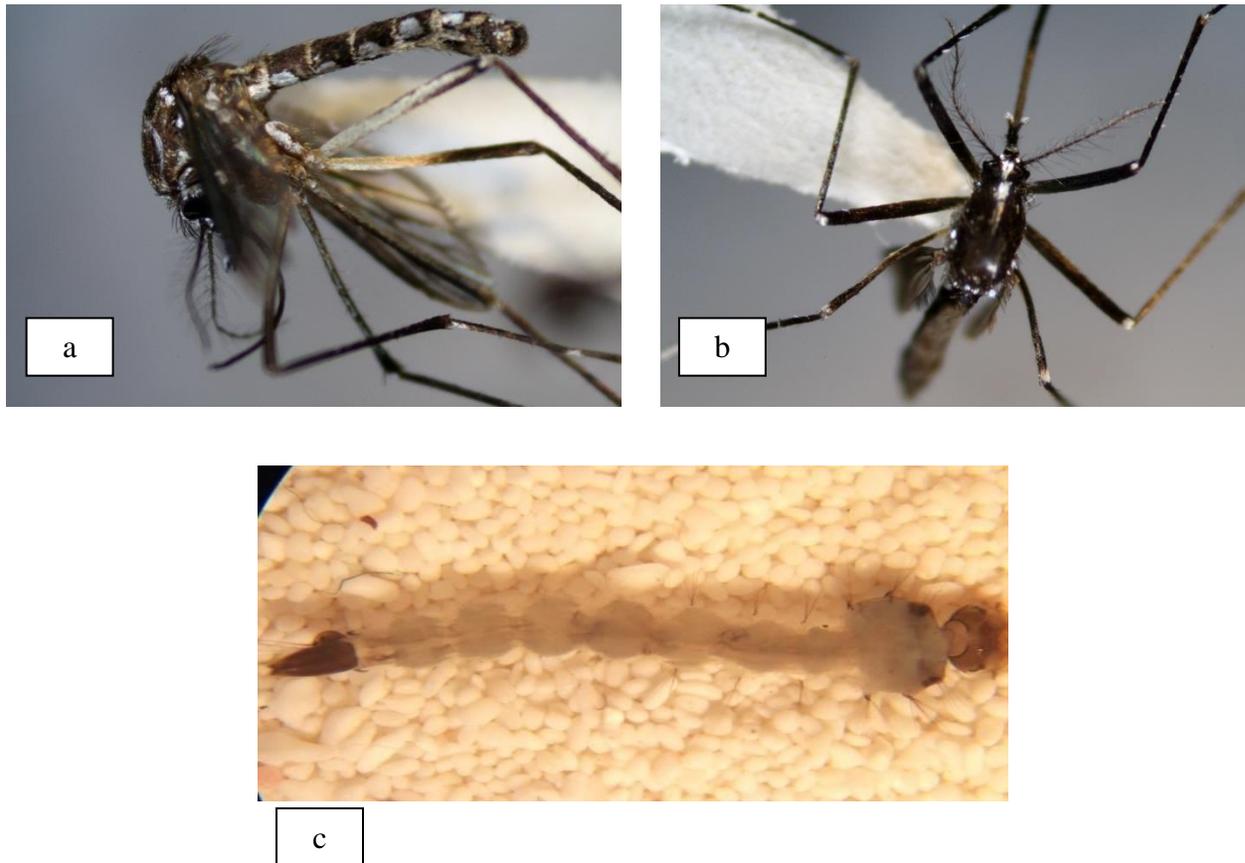


Figura 5. a) Mosquito *Aedes aegypti* (macho); b) *Aedes albopictus* (hembra); c) Larva de IV estadio, *Aedes aegypti* (alcohol etílico al 80%).



DETECCIÓN DE VIRUS DENGUE EN MUESTRAS DE MOSQUITOS

Las actividades para procesar las muestras de mosquitos y la formación de grupos (pools) de mosquitos están divididas en las siguientes etapas (Fig. 6).

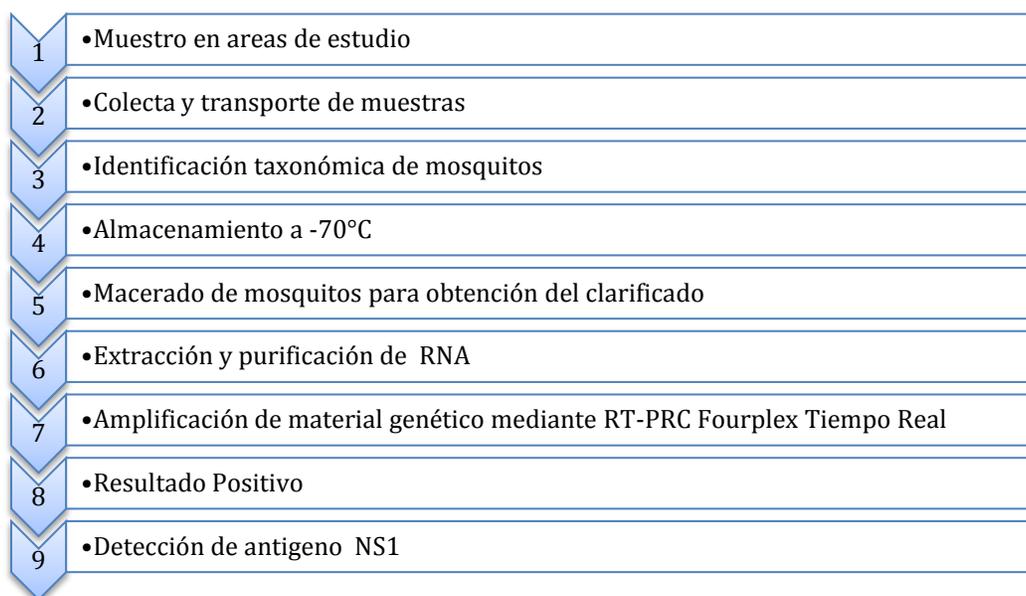


Figura 6. Etapas de estudio para aislamiento viral en mosquitos *Aedes*.

MACERADO DE LOS MOSQUITOS

Se forman grupos de mosquitos entre 20 y 30 especímenes en promedio separando hembras y machos, y de acuerdo a su lugar de colecta. Cada grupo se homogeniza con 1,600 μ L de medio MEM suplementado -medio esencial mínimo complementado con 1% de amino ácidos no esenciales, 1% de L-glutamina, 1% de vitaminas y 6% suero fetal bovino como criopreservador (todos los reactivos fueron adquiridos de GIBCO-Invitrogen, Inc. Grand Island, NY)- los cuales fueron macerados en morteros de porcelana. La suspensión se clarificó por centrifugación a 2500 rpm por 10 minutos a 4°C en una centrifuga refrigerada (2300K, HRMELE). A partir del clarificado se realizaron tres alícuotas de 500 μ L, se colocaron en criotubos de tapa de rosca estériles y se almacenaron a -80°C para su posterior procesamiento.

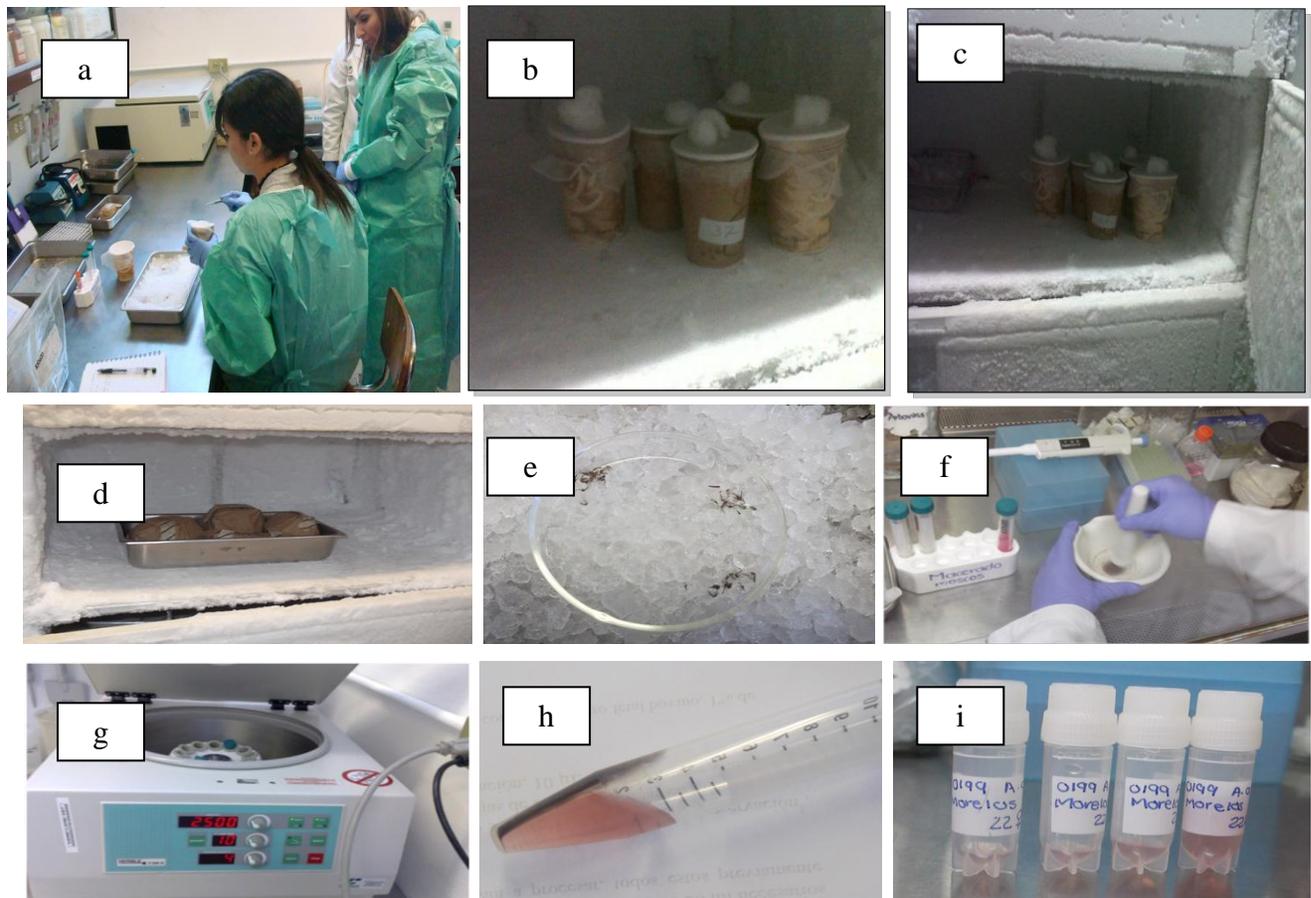


Figura 7. Preparación para el macerado de mosquitos. a) Separación de material. b-d) muestras preservadas a -70°C , e) mosquitos en hielo, f) Macerado, g) centrifugación del macerado, h) Obtención de clarificado e i) Alícuotas de trabajo.

REFERENCIAS

- Bio-Rad. 2008. Platelia™ Dengue NS1 AG, Qualitative or semicuantitativa detection of dengue virus NS1 antigen in human serum or plasma by enzyme immunoassay, France, 2008, pp 58-70.
- Diario Oficial de la Federación. 2010. Norma Oficial Mexicana NOM-032-SSA2-2010, Para la vigilancia epidemiológica, prevención y control de enfermedades transmitidas por vector.
- Manrique-Saide P, Azael Che-Mendoza, Nidia Rizzo, Byron Arana, Daniel Pilger, Audrey Lenhart, Axel Kroeger. 2011. *Operational guide for assessing the productivity of Aedes aegypti breeding sites*. Web publication by TDR-WHO Available at



<http://apps.who.int/tdr/publications/tdr-research-publications/sop-pupal-surveys/pdf/sop-pupal-surveys.pdf>.

Villegas-Trejo, A., Manrique-Saide P., Che-Mendoza A., Cruz-Canto W., González-Fernández M., González-Acosta C., Dzul-Manzanilla F., Huerta H. & Arredondo-Jiménez J. I. (2010). First report of *Aedes albopictus* and other mosquito species in Morelos, Mexico. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 26(3): 321-323.

WHO. 2009. *Dengue guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control*. http://whqlibdoc.who.int/publications/2009/9789241547871_eng.pdf.

