



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

Dirección General de Estudios de Posgrado

Facultad de Ciencias Biológicas

Unidad de Posgrado

**Identificación molecular de fuentes de alimentación en
vectores virales (Díptera: Culicidae) provenientes de
zonas endémicas de arbovirosis en Loreto**

TESIS

Para optar el Grado Académico de Magíster en Biología
Molecular

AUTOR

Pedro Miguel PALERMO INFANTE

ASESORES

Egma Marcelina MAYTA HUATUCO

Carolina GUEVARA

Lima, Perú

2017



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Palermo, P. (2017). *Identificación molecular de fuentes de alimentación en vectores virales (Díptera: Culicidae) provenientes de zonas endémicas de arbovirosis en Loreto*. [Tesis de maestría, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Ciencias Biológicas, Unidad de Posgrado]. Repositorio institucional Cybertesis UNMSM.

1534



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

(Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA)

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



VICEDECANATO DE INVESTIGACION Y POSGRADO

UNIDAD DE POSGRADO

Exped. N° 153-UPG-FCB-2017

104

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS PARA OPTAR AL GRADO ACADÉMICO DE MAGÍSTER EN BIOLOGÍA MOLECULAR

Siendo las 13:40 horas del día 15.12.17 en el Salón de Grados de la Facultad de Ciencias Biológicas, el Jurado Examinador presidido por:

- | | |
|--|-----------------|
| Dr. Armando Yarleque Chocas | e integrado por |
| Mg. Ruth Hortensia García de la Guarda | (Miembro) |
| Dr. Dan Erick Vivas Ruíz | (Miembro) |
| Dr. Enrique Walter Mamani Zapana | (Miembro) |
| Dra. Egma Marcelina Mayta Huatuco | (Asesora) |

Se reunió para la sustentación oral y pública de la Tesis para optar al Grado Académico de Magíster en Biología Molecular que solicitara el Bachiller Don **PEDRO MIGUEL PALERMO INFANTE**.

Después de darse lectura al Expediente N° 153-UPG-FCB-17, en el que consta haberse cumplido con todas las disposiciones reglamentarias, los señores miembros del Jurado, recepcionaron la exposición de la Tesis Titulada:

"IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE FUENTES DE ALIMENTACIÓN EN VECTORES VIRALES (DÍPTERA: CULICIDAE) PROVENIENTES DE ZONAS ENDÉMICAS DE ARBOVIROSIS EN LORETO" y formuladas las preguntas, éstas fueron absueltas por el graduando.

DEDICATORIA

A mi abuelo Dionicio Infante, por sus enseñanzas, consejos y darme la oportunidad de estar aquí, ¡Gracias compadre!

A mis padres Prudencio y María por su infinito apoyo, formación, cariño, amor y creer en mí, en cada etapa de mi desarrollo profesional y personal. A mis hermanas Paola y Karina por su eterna amistad, comprensión, enseñanzas y hacerme sentir orgulloso de ellas.

A Jeanette, por darme la oportunidad de formar parte de su vida, de sus sentimientos, amistad, motivación, perseverancia y profesionalismo. A mi pedacito de cielo, Marcelo, que me muestra que la felicidad se encuentra alrededor de uno mismo.

AGRADECIMIENTOS

Al Centro de Investigación de Enfermedades Tropicales “Naval Medical Research Center Unit-6” (NAMRU-6), por brindarme la oportunidad de desarrollar la presente tesis y permitir desarrollarme profesionalmente.

A la Dra Patricia Aguilar por su asesoramiento en el desarrollo de la tesis y sus valiosos consejos y sugerencias.

Al Dr. Eric Halsey por sus correcciones en la presentación de los resultados de la tesis, así como al Dr. Willy Lescano, por permitirme realizar la presente tesis.

A la Magister Carolina Guevara, por su apoyo, confianza y consejos en la realización de la tesis, así como en mi desarrollo académico y profesional.

A mis compañeros y amigos del NAMRU-6 y los integrantes del Departamento de Virología. A Zonia Ríos y mis amigas del laboratorio de PRNT, Diana, Elizabeth, Alicia, Jennifer y Angélica, por su amistad y darme la oportunidad de iniciarme en el mundo de la Virología. A Vidal Felices, Roger Castillo, Alfredo Huamán, Juan Sulca, Cecilia Rivera, muchas gracias por sus enseñanzas, confianza, amabilidad, disciplina, apoyo técnico en el desarrollo de la tesis y en el ámbito profesional y laboral.

A mí colega José Luis Rodríguez y veterinarios de la Universidad de San Marcos por su apoyo en obtener material biológico de animales.

A la Dra Carmen Flores, Dr. Roberto Fernández y Bgo Víctor Zorrilla por sus enseñanzas en la identificación taxonómica de los mosquitos, así como amistad y motivación en la presente tesis.

A mis amigos Dr. Dan Vivas y Dr. Marcos Sulca, muchas gracias estimados por su valiosa amistad, empuje, crítica y profesionalismo, valen un Perú muchachos.

A todas las personas que me ayudaron directa o indirectamente en el desarrollo de la presente tesis.

ÍNDICE

RESUMEN

ABSTRACT

LISTA DE TABLAS

LISTA DE FIGURAS

ABREVIATURAS

LISTA DE SIGLAS DE VIRUS

| | | |
|-------------|---|----|
| I. | INTRODUCCIÓN | 1 |
| II. | ANTECEDENTES | 3 |
| | II.1 Generalidades | 3 |
| | II.2 Clasificación | 3 |
| | II.3 Aspectos clínicos | 5 |
| | II.4 Transmisión de los arbovirus | 6 |
| | II.5 Fuentes de alimentación de mosquitos | 9 |
| | II.6 Identificación de fuentes de alimentación en mosquitos | 10 |
| III. | HIPÓTESIS Y OBJETIVOS | 13 |
| IV. | MATERIALES Y MÉTODOS | 14 |
| | IV.1 Materiales | 14 |
| | IV.1.1 Material biológico | 14 |
| | IV.1.1.1 Líneas celulares | 14 |
| | IV.1.1.2 Fluido ascítico hiperinmune de ratón | 14 |
| | IV.1.1.3 Mosquitos | 14 |
| | IV.2 Métodos | 15 |
| | IV.2.1 Colecta de especímenes | 15 |
| | IV.2.1.1 Descripción del área | 15 |
| | IV.2.1.2 Tipos de trampa | 16 |
| | IV.2.2 Identificación taxonómica | 18 |
| | IV.2.3 Estandarización de condiciones | 19 |
| | IV.2.3.1 Extracción de DNA a partir de sangre | 19 |
| | IV.2.3.2 Reacción en cadena de polimerasa (PCR) | 20 |
| | IV.2.3.3 Electroforesis de DNA | 21 |
| | IV.2.4 Sensibilidad del PCR de <i>citocromo b</i> | 21 |

| | |
|---|-----------|
| IV.2.5 Rendimiento del PCR de <i>citocromo b</i> | 21 |
| IV.2.6 Extracción de DNA del abdomen de mosquitos con evidencia de sangre | 21 |
| IV.2.7 PCR del gen de <i>citocromo b</i> de la sangre presente en el abdomen del mosquito | 23 |
| IV.2.7.1 <i>Citocromo b</i> de mamíferos | 23 |
| IV.2.7.2 <i>Citocromo b</i> de aves | 24 |
| IV.2.7.3 <i>Citocromo b</i> de reptiles | 25 |
| IV.2.8 Secuenciamiento | 26 |
| IV.2.9 Análisis Filogenético para secuencia de <i>Proechimys</i> | 27 |
| IV.2.10 Aislamiento viral por cultivo de células | 27 |
| IV.2.11 Cosecha Viral y fijación de las células infectadas | 29 |
| IV.2.12 Inmunofluorescencia indirecta (IFI) | 30 |
| IV.2.13 Extracción de RNA | 32 |
| IV.2.14 Reacción en cadena de la polimerasa de arbovirus | 33 |
| IV.2.14.1 Flavivirus | 33 |
| IV.2.14.2 Alfavirus | 35 |
| V. RESULTADOS | 38 |
| V.1 Estandarización de condiciones | 38 |
| V.1.1 Extracción y cuantificación de DNA | 38 |
| V.1.2 PCR de <i>citocromo b</i> de mamíferos | 39 |
| V.1.2.1 Gradiente de MgCl ₂ | 40 |
| V.1.2.2 Gradiente de temperaturas de alineamiento | 40 |
| V.1.3 PCR de <i>citocromo b</i> de aves | 42 |
| V.1.3.1 Gradiente de MgCl ₂ | 42 |
| V.1.3.2 Gradiente de temperaturas de alineamiento | 42 |
| V.1.3.3 Purificación del producto de PCR | 44 |
| V.1.4 PCR de <i>citocromo b</i> de reptiles | 46 |
| V.1.4.1 Gradiente de temperaturas de alineamiento | 46 |
| V.1.4.2 Gradiente de MgCl ₂ | 46 |
| V.2 Sensibilidad del PCR de <i>citocromo b</i> | 47 |
| V.3 Rendimiento del PCR de <i>citocromo b</i> | 48 |
| V.4 Identificación de especímenes | 51 |
| V.5 Identificación de fuentes de alimentación | 53 |
| V.5.1 Extracción y cuantificación de DNA | 53 |

| | |
|--|-----------|
| V.5.2 PCR de <i>citocromo b</i> | 54 |
| V.5.3 Secuenciamiento | 58 |
| V.5.4 Fuentes de alimentación encontradas de acuerdo al tipo de trampa | 64 |
| V.6 Aislamiento viral | 66 |
| V.7 Inmunofluorescencia indirecta | 68 |
| V.8 Reacción en cadena de polimerasa de arbovirus | 69 |
| VI. DISCUSIÓN | 71 |
| VI.1 Extracción de DNA | 71 |
| VI.2 PCR de <i>citocromo b</i> | 72 |
| VI.3 Identificación de fuentes de alimentación en los mosquitos | 74 |
| VI.4 Aislamiento viral | 81 |
| VII. CONCLUSIONES | 82 |
| VIII. RECOMENDACIONES | 83 |
| IX. ANEXOS | 84 |
| X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 96 |

RESUMEN

Los arbovirus son un grupo de agentes virales, que son considerados como los agentes etiológicos de las más importantes enfermedades humanas en el mundo, siendo los mosquitos hematófagos (*Culicidae*) responsables de la transmisión viral. Estos mosquitos se distribuyen en la mayoría de áreas geográficas del mundo y tienen alto potencial de transmitir los virus hacia un gran número de hospederos humanos o animales, de acuerdo a sus preferencias de alimentación. La dinámica de transmisión de muchos arbovirus en la Cuenca del Amazonas en el Perú aún no está completamente dilucidada, incluyendo los vectores y reservorios naturales. La presente tesis tuvo por finalidad identificar las fuentes de alimentación en mosquitos colectados en áreas endémicas de arbovirosis en el Departamento de Loreto utilizando herramientas moleculares, y evaluar la presencia de arbovirus en tales mosquitos. De enero a marzo del 2009, los mosquitos fueron recolectados en las provincias de Alto Amazonas y Datem del Marañón, utilizando trampas de luz CDC, cebo humano y mochilas aspiradoras. Un total de 125 mosquitos colectados con evidencia de sangre fueron identificados usando claves dicotómicas, homogenizados individualmente, sometidos a extracción de DNA y amplificación de PCR utilizando 3 sets de primers consenso dirigidos al gen del *citocromo b* de mamíferos, aves y reptiles. El rendimiento del ensayo molecular fue previamente validado usando DNA extraído de sangre de vertebrados conocidos. Se obtuvieron amplicones de PCR en 115 (92%) mosquitos, y fueron secuenciados para identificar al potencial hospedero. *Psorophora albigena*, *Ochlerotatus serratus* y *Och. fulvus* tuvieron comportamiento de alimentación ecléctico, *Culex (Melanoconiom) vomerifer* y *Cx. (Aedinus) amazonensis* se alimentaron de ratas espinosas. *Cx. (Mel.) dunnii* y *Cx. (Mel.) occosa* se alimentaron de un gato y un oso perezoso respectivamente. *Ps. cingulata*, *Mansonia humeralis*, *Anopheles oswaldoi* s.l., *An. benarrochi* tuvieron comportamientos antropofílicos. Éste es el primer estudio que identificó fuentes de alimentación en *Cx. (Mel.) spp.*, *Ps. albigena*, *Och. serratus*, *Och. fulvus*, y que soporta sus roles como vectores en el ciclo de transmisión de alfavirus en la Cuenca Amazónica del Perú.

Palabras clave: Arbovirus, *citocromo b*, fuentes de alimentación, Loreto, mosquitos

ABSTRACT

Arboviruses are a group of viral agents which are considered the etiologic agents of the main human diseases around the world, being the blood-sucking mosquitoes (*Culicidae*) responsible for viral transmission. These mosquitoes are distributed in most geographical areas of the world and have high potential to transmit the virus to a large number of humans or animals hosts according to its feeding preferences. The transmission dynamics of many arboviruses in the Peruvian Amazon Basin is not yet fully elucidated, including their vectors and natural reservoirs. This thesis aimed to identify blood meal sources of mosquitoes collected in areas endemic of arboviruses in the Department of Loreto using molecular approaches and to evaluate the presence of arboviruses in such mosquitoes. Mosquitoes were collected in the provinces of Alto Amazonas and Datem del Marañón using CDC light traps, human bait, and backpack aspirators from January to March 2009. A total of 125 mosquitoes collected with evidence of blood were identified using dichotomous keys, individually homogenized, subjected to DNA extraction and PCR amplification using 3 sets of consensus primers directed to *cytochrome b* gene of mammals, birds, and reptiles. The molecular assay performance was previously validated using DNA extracted from known vertebrate blood. PCR amplicons were obtained in 115 (92%) mosquitoes and were sequenced to identify the putative host. *Psorophora albigena*, *Ochlerotatus serratus* and *Och. fulvus* had an eclectic feeding behavior, *Culex (Melanoconiom) vomerifer* and *Cx. (Aedinus) amazonensis* fed on spiny rats. *Cx. (Mel.) dunni* and *Cx (Mel.) occosa* fed on a cat and sloth respectively. *Ps. cingulata*, *Mansonia humeralis*, *Anopheles oswaldoi* s.l., *An.benarrochi* had anthropophilic behavior. This is the first study that identified blood meal sources in *Cx. (Mel.) spp.*, *Ps. albigena*, *Och. serratus*, *Och. fulvus*, and supporting their roles as vectors in the transmission cycle of alphaviruses in the Peruvian Amazon Basin.

Keywords: Arboviruses, *cytochrome b*, blood meal, Loreto, mosquitoes

LISTA DE TABLAS

| | | Pág. |
|-----------------|---|------|
| Tabla 1 | Relación de animales observados en cada localidad en áreas intradomiciliarias y peridomiciliarias en Loreto (2009) | 16 |
| Tabla 2 | Número de casas /localidad donde se colectaron mosquitos usando mochilas aspiradoras en Loreto (2009) | 17 |
| Tabla 3 | Componentes utilizados en el PCR de <i>citocromo b</i> de mamíferos | 23 |
| Tabla 4 | Componentes utilizados en el PCR de <i>citocromo b</i> de aves | 24 |
| Tabla 5 | Componentes utilizados en el PCR de <i>citocromo b</i> de reptiles | 25 |
| Tabla 6 | Reacción de secuenciamiento de DNA | 26 |
| Tabla 7 | Reactivos utilizados en la reacción de RT-PCR de Flavivirus | 33 |
| Tabla 8 | Reactivos utilizados en la reacción Nested PCR de Flavivirus | 34 |
| Tabla 9 | Reactivos utilizados en la transcripción reversa de Alfavirus | 36 |
| Tabla 10 | Reactivos utilizados en la reacción de PCR de Alfavirus | 36 |
| Tabla 11 | Cantidad de DNA (ng) obtenida por μL de sangre con anticoagulante de aves y mamíferos peridomésticos. Promedio \pm DS, (n = 3) | 38 |
| Tabla 12 | Identificación de especies de vertebrados putativamente en el secuenciamiento de productos de PCR de <i>citocromo b</i> de aves y de mamíferos | 50 |
| Tabla 13 | Mosquitos con evidencia de sangre identificados a nivel de especie (n =125) | 52 |
| Tabla 14 | Distribución de las fuentes de alimentación encontradas en los mosquitos colectados en Loreto (2009) usando diferentes tipos de trampas. | 65 |
| Tabla 15 | Identificación de fuentes de alimentación de mosquitos colectados durante enero-marzo 2009 y virus asociados con estos mosquitos. (EEEV: virus de Encefalitis Equina del Este, TROV: Trocara virus, VEEV: virus de Encefalitis Equina Venezolana, GpCV: virus del Grupo C, MURV: Virus Murutucu, GUAV: virus Guaroa virus, UnaV: virus Una). 2 especímenes de mosquitos ^(a) con doble fuente de alimentación identificado (*). | 80 |

LISTA DE FIGURAS

| | | Pág. |
|------------------|---|------|
| Figura 1 | Mecanismos típicos de transmisión de arbovirus emergentes (Weaver, 2010). | 7 |
| Figura 2 | <i>Aedes aegypti</i> alimentándose de un hospedero humano. | 10 |
| Figura 3 | Localización de las áreas de estudio en el Departamento de Loreto-2009. | 15 |
| Figura 4 | Selección de mosquitos con evidencia de sangre en el abdomen. (A) Colocados en tubos de 1,5 mL (B) y conservados a -70 °C. | 18 |
| Figura 5 | Separación del abdomen del cefalotórax. | 22 |
| Figura 6 | Aislamiento viral por cultivo de células a partir de mosquitos. (A) Células C6/36 y Vero 76 previas a la infección (B) Monitoreo de efecto citopático en células Vero 76 y (C) en células C6/36. | 29 |
| Figura 7 | Distribución de los pellets de células C6/36 y Vero 76 de una muestra infectada (Muestra 1) en la lámina de 24 pozos. Controles negativos son células C6//36 y Vero 76 no infectadas. | 30 |
| Figura 8 | Distribución de los fluidos ascíticos hiperinmunes de ratón (FLAVI, Flavivirus; ALFA, Alfavirus; BUNYA, Bunyavirus; ARENA/EMCV, Arenavirus/ Encefalomiocarditis) en la lámina de 24 pozos para la prueba de IFI. | 31 |
| Figura 9 | Representación esquemática de la Inmunofluorescencia indirecta para la detección de antígenos virales en las células infectadas. * HMAF (fluidos ascíticos hiperinmunes de ratón). | 32 |
| Figura 10 | PCR de <i>citocromo b</i> de mamíferos. Línea 1-3, DNA de perro (10 ng, 5 ng, y 1 ng); línea 4 y 5, DNA de caballo (10 ng y 5 ng); línea 6, DNA de gato (5 ng); Línea 7, control de extracción (negativo); línea 8, blanco de PCR. M, marcador de 100 pb. | 39 |
| Figura 11 | Gradiente de MgCl ₂ para el PCR de <i>citocromo b</i> de mamíferos. Línea 1, 1 mM MgCl ₂ ; línea 2, 1,5 mM MgCl ₂ ; línea 3, 2 mM MgCl ₂ ; línea 4, 2,5mM MgCl ₂ . M, marcador de 100 pb. | 40 |
| Figura 12 | Gradiente de temperaturas de alineamiento para el PCR de <i>citocromo b</i> de mamíferos. Línea 1, 48 °C; línea 2, 52 °C; línea 3, 55 °C; línea 4, 58 °C; línea 5, 60 °C; línea 6, 64 °C. M, marcador de 100 pb. | 41 |
| Figura 13 | PCR de <i>citocromo b</i> de mamíferos con optimización de parámetros. Línea 1 y 2 DNA de perro (10 ng); línea 3-5 DNA de ratón (5 ng, 10 ng y 15 ng); línea 6, blanco de PCR. M, marcador de 100 pb. | 41 |
| Figura 14 | Gradiente de MgCl ₂ para el PCR de <i>citocromo b</i> de aves. Línea 1, 1 mM MgCl ₂ ; línea 2, 1,5 mM MgCl ₂ ; línea 3, 2 mM MgCl ₂ ; línea 4, 2,5mM MgCl ₂ . M, marcador de 100 pb. | 42 |
| Figura 15 | PCR en gradiente de <i>citocromo b</i> de aves a partir de muestras de sangre de gallina. Línea 1, 45 °C; línea 2, 48 °C; línea 3, 50 °C; línea 4, 53 °C; línea 5, 55 °C. M, marcador de 100 pb. | 43 |
| Figura 16 | PCR en gradiente de <i>citocromo b</i> de aves a partir de muestras de sangre de pato. Línea 1, 45 °C; línea 2, 48 °C; línea 3, 50 °C; línea 4, 53 °C; línea 5, 55 °C. Línea 6, 58 °C. M, marcador de 100 pb. | 43 |
| Figura 17 | Electroforesis en gel de agarosa 2% para purificación de bandas a partir de gel. Línea 1, Producto de PCR. M, marcador de 100 pb. | 44 |
| Figura 18 | Electroforesis en gel de agarosa 2% de las bandas purificadas del gel. Línea 1, Banda superior; línea 2, banda inferior. M, marcador de 100 pb. | 44 |
| Figura 19 | Reamplificación de los productos purificados de PCR de <i>citocromo b</i> de aves. Línea 1, reamplificado del producto de PCR inicial; línea 2, reamplificado de la banda inferior; | 45 |

| | | |
|------------------|--|----|
| | línea 3, reamplificado de banda superior. M, marcador de 100 pb. | |
| Figura 20 | Gradiente de temperaturas de alineamiento PCR de <i>citocromo b</i> de reptiles. Línea 1, 46 °C; línea 2, 48 °C; línea 3, 50 °C; línea 4, 53 °C; línea 5, 56 °C; línea 6, 60 °C. M, marcador de 100 pb. | 46 |
| Figura 21 | Gradiente de MgCl ₂ para el PCR de <i>citocromo b</i> de reptiles. Línea 1, 1 mM MgCl ₂ ; línea 2, 1,5 mM MgCl ₂ ; línea 3, 2 mM MgCl ₂ ; línea 4, 2,5 mM MgCl ₂ ; M, marcador de 100 pb. | 47 |
| Figura 22 | Sensibilidad del PCR de <i>citocromo b</i> de aves (A), mamíferos (B) y reptiles (C) a diferentes concentraciones de DNA. Línea 1, 10 ng; línea 2, 1 ng; línea 3, 100 pg; línea 4, 10 pg y línea 5, 1 pg. M, marcador de 100 pb. | 47 |
| Figura 23 | Análisis de PCR de las muestras de DNA de aves y mamíferos usando primers de <i>citocromo b</i> de aves (A) y primers de <i>citocromo b</i> de mamíferos (B). Línea 1-7, DNA de aves (gallina, pato, loro, tordo, pavo, loro, loro); línea 8-13, DNA de mamíferos (perro, caballo, humano, cerdo, ratón y gato); línea 14, negativo. M, marcador de 100 pb. | 48 |
| Figura 24 | Mosquitos con evidencia de sangre en el abdomen colectados en las provincias de Datem el Maraón y Alto Amazonas entre enero-marzo del 2009. | 51 |
| Figura 25 | <i>Ochlerotatus serratus</i> (A) y <i>Ochlerotatus fulvus</i> (B) | 52 |
| Figura 26 | Rango de cantidad de DNA obtenido (ng/μL) de los mosquitos con evidencia de sangre en el abdomen colectados en las provincias de Datem el Maraón y Alto Amazonas entre enero-marzo del 2009. | 53 |
| Figura 27 | Análisis del PCR para la identificación de fuentes de alimentación de mosquitos, usando primers de <i>citocromo b</i> de mamíferos (A) y primers de <i>citocromo b</i> de aves (B). Línea 1-9, <i>Ps. albigenu</i> ; línea 10-13, <i>Och serratus</i> ; línea 14-16, <i>Cx. (Mel.) vomerifer</i> ; línea 17, control negativo; línea 18, control positivo. M, marcador de 100 pb. | 54 |
| Figura 28 | Análisis del PCR para la identificación de fuentes de alimentación de mosquitos, usando primers de <i>citocromo b</i> de mamíferos (A) y primers de <i>citocromo b</i> de aves (B). Línea 1-2, <i>Ps. cingulata</i> ; línea 3-13, <i>Och. serratus</i> ; línea 14, <i>Cx. (Mel.) dunni</i> ; línea 15, <i>Cx. (Mel.) occosa</i> ; línea 16, <i>Cx. (Mel.) vomerifer</i> ; línea 17, control positivo; línea 18, control negativo. M, marcador de 100 pb. | 55 |
| Figura 29 | Análisis del PCR para la identificación de fuentes de alimentación de mosquitos, usando primers de <i>citocromo b</i> de mamíferos (A) y primers de <i>citocromo b</i> de aves (B). Línea 1-3, <i>An. benarrochi</i> ; línea 4-6, <i>Och serratus</i> ; línea 7-10, <i>M. humeralis</i> ; línea 11-16, <i>Ps. albigenu</i> ; línea 17, control negativo; línea 18, control positivo. M, marcador de 100 pb. | 56 |
| Figura 30 | Análisis del PCR para la identificación de fuentes de alimentación de mosquitos usando primers de <i>citocromo b</i> de reptiles. Línea 1-4, <i>Och. serratus</i> ; línea 5-7, <i>Cx. (Mel.) vomerifer</i> ; línea 8-10, <i>Och.fulvus</i> ; línea 11, <i>Mansonia humeralis</i> ; línea 12, <i>Cx. (Aedinus) amazonensis</i> ; línea 13-14, <i>Ps. albigenu</i> ; línea 15, control negativo; línea 16, control positivo. M, marcador de 100 pb. | 57 |
| Figura 31 | Distribución del número de amplicones de PCR para cada set de primers de <i>citocromo b</i> (porcentaje). | 58 |
| Figura 32 | Cromatograma de una secuencia de <i>citocromo b</i> de la sangre del hospedero presente en un mosquito <i>Ps. albigenu</i> . | 59 |
| Figura 33 | Identificación de fuente de alimentación (<i>Homo sapiens</i>) de un mosquito por identidad nucleotídica en el Genbank. | 59 |
| Figura 34 | Doble fuente de alimentación detectada en mosquitos. En <i>Psorophora albigenu</i> (A) y en <i>Culex Melanoconion dunni</i> (B). | 60 |
| Figura 35 | Distribución de los amplicones de <i>citocromo b</i> (n = 130) obtenidos y secuenciados a | 61 |

partir de los mosquitos colectados en el Departamento de Loreto (2009).

- Figura 36** Cladograma de máxima parsimonia para los primeros 690 pb del gen de *citocromo b* para las ratas espinosas *Proechimys* en el Perú. Letras de colores representan las secuencias de *citocromo b* de *Proechimys* encontradas en los mosquitos en las diferentes localidades. Cada color de nodo corresponde a una especie de *Proechimys* en el Perú. Números en los nodos son valores de bootstrap (100 replicas) por encima de 50%. Secuencias de *Echymis* e *Isothrix* fueron los grupos externos. 62
- Figura 37** Composición de las fuentes de alimentación derivados de mosquitos colectados en el Departamento de Loreto. Número de hospederos identificados (% de identidad nucleotídica en la base de datos Genbank). Celda amarilla, representa doble fuente de alimentación. 63
- Figura 38** Cultivo de células (C6/36 y Vero 76) inoculado con pool de mosquito 23 y 30, y su efecto citopático (ECP) durante 12 días postinfección (0, 4, 8 y 12) luego de realizar 3 pasajes consecutivos. El control (+) fue inoculado con virus del Dengue-4, y el control (-) no fue inoculado. 67
- Figura 39** Inmunofluorescencia indirecta para detección de antígeno de Flavivirus en el cultivo celular (C6//36 y Vero 76) de un pool de mosquito pasaje3 (pool 23p3). Se consideró el control positivo (células infectadas con virus del Dengue 4) y el control negativo (células no infectadas). 68
- Figura 40** Análisis del PCR para la identificación de Flavivirus (**A**) y de Alfavirus (**B**). Línea1-10, muestras con ligero CPE; línea 11, control negativo; línea 12, control positivo. M, marcador de 100 pb. 69
- Figura 41** Identificación de amplicón obtenidos en el PCR de Alfavirus por identidad nucleotídica en el Genbank. 70

ABREVIATURAS

| | |
|-------------------|--|
| ATCC | American Type Culture Collection |
| DNA | Acido Desoxirribonucleico |
| RNA: | Acido Ribonucleico |
| dNTP | Desoxirribonucleósidos trifosfato |
| dpi | Días post infección |
| ECP | Efecto citopático |
| EDTA | Acido etilen diamino tetraacético |
| ELISA: | Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzima |
| FBS | Suero fetal bovino |
| FITC | Isotiocianato de fluoresceína conjugado con IgG de ratón |
| ICTV | Comité Internacional de Taxonomía de virus |
| Kb | Kilobase |
| M | Molar |
| mA | Miliamperios |
| MgCl ₂ | Cloruro de magnesio |
| mM | Milimolar |
| nm | Nanómetro |
| ORF | Open Reading Frame |
| pH | Potencial de hidrógeno |
| pb | Pares de bases |
| PBS | Buffer fosfato salino |
| PCR | Reacción en cadena de polimerasa |
| pg | Picogramo |
| rpm | Revoluciones por minuto |
| TBE | Tris/Borato/EDTA |
| Tris | Tris hidroximetil aminometano |
| V | Voltios |
| W | Watts |
| µL y µg | Microlitro y microgramo |

LISTA DE SIGLAS DE VIRUS DE ACUERDO AL COMITÉ INTERNACIONAL DE TAXONOMIA DE VIRUS (ICTV)

| | |
|-------|--|
| APEUV | Virus Apeu |
| CARV | Virus Caraparu |
| CATUV | Virus Catu |
| CEV | Virus encefalitis de California |
| CHIKV | Virus Ckikungunya |
| DENV | Virus del Dengue |
| EEEV | Virus encefalitis equina del Este |
| GROV | Virus Guaroa |
| ILHV | Virus Ilheus |
| JEV | Virus de encefalitis Japonesa |
| LACV | Virus Lacrosse |
| MAGV | Virus Maguari |
| MAYV | Virus Mayaro |
| MTBV | Virus Marituba |
| MUCV | Virus Mucambo |
| MURV | Virus Murutucu |
| ROCV | Virus Rocio |
| RVFV | Virus del valle del Rift |
| SLEV | Virus encefalitis de San Luis |
| UNAV | Virus Una |
| VEEV | Virus de encefalitis equina Venezolana |
| WEEV | Virus de encefalitis equina del Oeste |
| WNV | Virus del Oeste del Nilo |
| YFV | Virus de fiebre amarilla |
| ZIKV | Virus Zika |

I. INTRODUCCIÓN

Los arbovirus, también conocidos como virus transmitidos por artrópodos, son uno de los grupos de agentes causante de las más importantes enfermedades humanas en el mundo (Weaver, 2010). Entre los virus de mayor importancia, desde el punto de vista clínico, se encuentran el virus del dengue (DENV), seguido por el virus de la fiebre amarilla (YFV), el virus Chikungunya (CHIKV), el virus Zika (ZIKV), el virus de la encefalitis de San Luis (SLEV), el virus del oeste del Nilo (WNV), virus de la encefalitis japonesa (JEV), entre otros (Bres, 1988; Weaver, 2010).

La transmisión de los arbovirus, como el causante del dengue, se ha ido extendiendo en países tropicales y subtropicales, constituyendo una amenaza para 2,500 millones de personas (CDC, 2001) debido a que aproximadamente más de la mitad de la población mundial vive en zonas infestadas por los mosquitos *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus*, los cuales transmiten esta enfermedad (Gubler, 1989). En tanto en la trasmisión de otros arbovirus como el virus de oeste del Nilo (WNV) y el virus de encefalitis equina Venezolana (VEEV) se encuentran involucrados mosquitos del género *Culex* (Anderson et al., 1999; Lanciotti et al., 1999; Lillibridge et al., 2002; Galindo, 1971).

Los mosquitos de la Familia *Culicidae* responsables de la transmisión viral son hematófagos, y se distribuyen en la mayoría de áreas geográficas en el mundo. En consecuencia, estos mosquitos tienen alto potencial de transmitir los virus hacia un gran número de hospederos humanos, animales salvajes o domésticos que cohabiten con ellos. Durante muchos años se han aislado múltiples arbovirus a partir de diversos mosquitos de la Familia *Culicidae*, lo cual permitió incriminarlos como vectores virales y considerarlos miembros importantes en la epidemiología de enfermedades virales (Johansen et al., 2000; O'Guinn et al., 2004). A pesar de ello, en la actualidad aún no está determinado el ciclo de transmisión y la ecología de algunos arbovirus en áreas endémicas de arbovirosis, por lo que se estima que los arbovirus puedan ser mantenidos en un ciclo enzoótico involucrando varias especies de mosquitos (*Culicidae*) como vectores principales; así como mamíferos o aves como hospederos vertebrados

naturales (de Thoisy, 2003, Watts et al., 1997a, 1998). Adicionalmente, los mosquitos presentan un patrón de alimentación hacia ciertos vertebrados (Tempelis, 1975), el cual permite asociarlos potencialmente con los hospederos naturales de los arbovirus.

En el Perú, la epidemiología de las enfermedades virales (Dengue, Mayaro, Oropouche, Fiebre amarilla, Encefalitis equina venezolana, entre otros) transmitidas por mosquitos en la cuenca del Amazonas es poco entendida (Turell et al., 2005), así como los ciclos de transmisión y dispersión del virus, por lo que la identificación del patrón de alimentación de los mosquitos ayudaría a predecir el rol de los hospederos en la ecología de los arbovirus en un área determinada del Perú.

En los últimos años el Departamento de Virología del Centro de Investigaciones de Enfermedades Tropicales NAMRU-6 ha realizado vigilancia de agentes virales en mosquitos provenientes de zonas endémicas de arbovirus en Loreto, sin embargo, no existen datos sobre los presuntos hospederos de los arbovirus. Es por ello que la presente investigación se basó en la identificación molecular de las fuentes de alimentación de los mosquitos asociados a virus, basados en la identificación y análisis de *citocromo b* de vertebrados mediante PCR.

II. ANTECEDENTES

II.1 GENERALIDADES

El uso del término virus transmitidos por artrópodos fue introducido en 1942, para describir los virus de animales que se propagaban por ciertas especies de mosquitos, garrapatas, zancudos (Subfamilia *Phlebotomidae*) y nematóceros (*Familia Ceratopogonidae*), y se transmitían biológicamente hacia hospederos vertebrados susceptibles. Inicialmente, los arbovirus fueron nombrados de acuerdo con la enfermedad que causaban en los humanos, como fiebre amarilla, dengue y chikunguya; luego, se volvió necesario agregar una connotación geográfica para diferenciar el virus causante, como virus de la encefalitis equina del Oeste o virus de encefalitis equina Venezolana. Finalmente, los arbovirus son nombrados de acuerdo con el lugar donde fueron aislados por primera vez incluso si ellos causan una enfermedad, tales como el virus Mayaro y el virus Rocio.

La interacción entre vector y vertebrado es una característica epidemiológica única, que permite el impacto de los arbovirus sobre comunidades de animales domésticos y humanos. Este impacto puede ser revelado por la aparición de las enfermedades en la comunidad, afectando la salud y actividades económicas de la población.

II.2 CLASIFICACIÓN

Los arbovirus fueron clasificados inicialmente como grupos antigénicos de acuerdo a sus propiedades serológicas como la inhibición de la hemaglutinación, fijación del complemento, ensayos de neutralización. Posteriormente, los análisis moleculares permitieron que sean clasificados como miembros de familias, serogrupos, complejos, tipos, subtipos y variedades, de acuerdo a criterios internacionales (Francki, 1991).

Los arbovirus están clasificados mayormente en cinco principales familias: *Togaviridae*, *Bunyaviridae*, *Reoviridae* (Orbivirus), *Rhabdoviridae*, *Flaviviridae*. Un

pequeño grupo de virus están clasificados de acuerdo al Catalogo Internacional de Arbovirus en otros taxa (Karabatsos, 1985).

- A. *Togaviridae*. Esta familia comprende dos géneros, siendo arbovirus solo los del género *Alphavirus*. Los viriones son esféricos, con envoltura y de aproximadamente 60 nm de diámetro. El genoma consiste en RNA de cadena simple y sentido positivo. La envoltura tiene 2-3 proteínas (E1, E2, E3), que son usualmente glicosiladas. La nucleocápside comprende el genoma asociado con la proteína de la cápside (C). Los Alfavirus están separados en seis complejos: Middelburg, Ndumu, Semliki, encefalitis del Oeste (WEEV), encefalitis equina Venezolana (VEEV) y encefalitis equina del Este (EEEV).

- B. *Bunyaviridae*. Son virus de RNA que comprenden 4 géneros que infectan vertebrados: *Bunyavirus*, *Nairovirus*, *Phlebovirus* y *Hantavirus*. Los 3 primeros son transmitidos por artrópodos y son divididos en subtipos, grupos antigénicos y variedades. Los virus del género *Hantavirus* se encuentran asociados a roedores y causan fiebres hemorrágicas con síndrome renal o pulmonar.

- C. *Reoviridae*. Comprende 6 géneros, siendo solo los géneros Orbivirus y Coltivirus los que son transmitidos por artrópodos. Los viriones son esféricos y carecen de envoltura. Presentan un genoma con doble cadena de RNA con 10 segmentos que codifican 10 polipéptidos.

- D. *Rhabdoviridae*. Los viriones son de forma de bala y presentan envoltura. Tienen un genoma de RNA de una sola cadena en sentido negativo, que codifica 5 proteínas (N, NS, G, M, L). Estos virus se encuentran asociados mayormente a animales, como el virus de la estomatitis vesicular.

- E. *Flaviviridae*. Los viriones son esféricos, con envoltura y de aproximadamente 30-40 nm de diámetro. El genoma es de RNA de sentido negativo, que se encuentra dentro de la cápside compuesta de un solo polipéptido (C). Existen alrededor de 66 flavivirus divididos en 7 complejos

serológicos basados en la reacción cruzada obtenida por pruebas de neutralización. Los virus de mayor importancia desde el punto de vista médico se encuentran en esta familia, destacando: el complejo de virus del oeste del Nilo (que incluye al virus Murray, WNV, SLEV y JEV) y el complejo de encefalitis (incluye encefalitis de verano ruso, fiebre hemorrágica Omsk y Powasan) y el complejo de dengue (serotipos de Dengue 1, 2, 3 y 4).

II.3 ASPECTOS CLÍNICOS

La heterogeneidad del grupo de arbovirus implica también manifestaciones clínicas diversas cuando causan enfermedad en los humanos, las cuales se pueden manifestar predominantemente en cuatro categorías: una enfermedad febril, fiebre hemorrágica, encefalitis y poliartritis. Sin embargo, algunos arbovirus causantes de un cuadro clínico febril hemorrágico y encefalitis pueden ocasionar además un síndrome febril sistémico e infecciones subclínicas consecuentes. Los síntomas más comunes son los siguientes:

- A. Fiebre, poco es conocido acerca de la patología de las fiebres indiferenciadas debido a que la mortalidad es rara. Los síntomas más comunes son fiebres indiferenciadas con una duración de 3-7 días (Monath, 1990). Los síntomas son abruptos, dolor de cabeza, malestar general con vómitos y náuseas, dolor retro-orbicular. En algunos casos ocurre leucopenia. Para algunos virus como la fiebre Colorado (CTF), Chikunguya (CHIKV), DENV y WNV, la fiebre es el principal síndrome clínico.
- B. Encefalitis, que es considerada el segundo síntoma más frecuente (Monath, 1990). La infección con arbovirus como el virus Lacrosse (LACV) SLEV, EEEV, WEEV y VEEV afectan el sistema nervioso central, pudiendo conllevar a casos fatales.
- C. Fiebre hemorrágica, las lesiones de fiebres hemorrágicas no son específicas. Una moderada a severa trombocitopenia es común y aparece

por la inactividad de los megacariocitos. La mayoría de infecciones con virus hemorrágicos resultan en fiebres moderadas que luego desarrollan la enfermedad severa. Los arbovirus que pueden causar fiebre hemorrágica incluyen al dengue, enfermedad de la selva de Kyasanur, fiebre hemorrágica del Congo, fiebre hemorrágica Omsk, fiebre del valle del Rift (RVFV) y fiebre amarilla (YFV).

D. Poliartritis, cuya base patofisiológica no es conocida. Algunos alfavirus como Ross River, Chikunguya, O'nyong nyong y Mayaro causan artritis y algunas veces sin fiebre (Tesh, 1982).

II.4 TRANSMISIÓN DE LOS ARBOVIRUS

Los arbovirus se mantienen en la naturaleza por ciclos que involucran a los vectores artrópodos y los hospederos vertebrados susceptibles. El hospedero inicial vertebrado desarrolla la viremia suficiente en un tiempo adecuado para que pueda infectar posteriormente a otro hospedero a través de vectores hematófagos que se alimenten del hospedero inicial.

La epidemiología de cada enfermedad ocasionada por los arbovirus está determinada por el ciclo entre el vector y el vertebrado natural. Esta actividad de los arbovirus es denominada como enzoótica, cuando ocurren casos esporádicos; o intermitentes, o epizoótica, cuando se dan brotes de manera significativa en un área en particular. Las infecciones mantenidas en ciclos enzooticos son causados generalmente por el ingreso del hombre o animales en el ciclo natural de transmisión del virus, estos ciclos se les conocen también como ciclos selváticos o rurales. En caso del ciclo epizoótico, la persona o animal infectado se convierte en un hospedero amplificador de la cadena de transmisión, iniciando un ciclo urbano e involucrando un vector artrópodo capaz de transferir el virus hacia personas o animales (Monath, 1988). Todos los artrópodos hematófagos son considerados potenciales vectores en la transmisión de arbovirus.

Durante las últimas décadas ha habido la resurgencia o emergencia de enfermedades epidémicas arbovirales como fiebre amarilla (Acha et al., 1987), dengue (Gubler, 1988; Guzmán et al., 1984; Herrera et al., 1988; Figuereido et al., 1990; Colan, 1991); encefalitis equina Venezolana entre 1992-1993 en Venezuela, y Colombia en 1995 (Weaver, 1996); encefalitis equina Japonesa (Solomon et al., 2003); fiebre del oeste del Nilo (Lanciotti et al., 1999); fiebre de Rocio (Burke, 2001) y recientemente la fiebre de chikungunya (Fischer et al., 2014) y fiebre del zika (Hennessey et al., 2016).

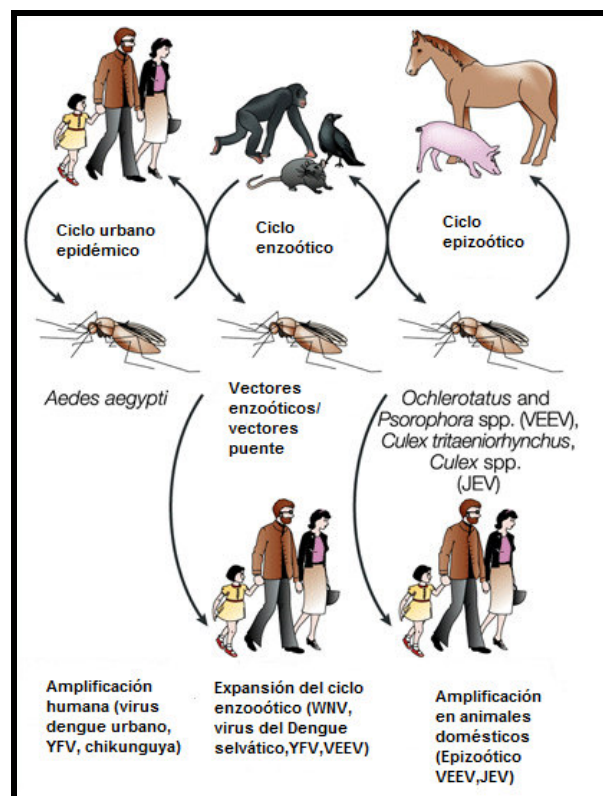


Figura 1: Mecanismos típicos de transmisión de arbovirus emergentes (Weaver, 2010)

Aedes aegypti y *Aedes albopictus* son los vectores de la transmisión de dengue en zonas urbanas hacia hospederos humanos, sin embargo, también se han encontrado en hábitats selváticos de Asia y Malasia ciclos que involucran primates no humanos como hospederos y vectores del género *Aedes* (*Stegomyia*) spp. (Rutnik, 1965)

En Sudamérica, la transmisión de fiebre amarilla se caracteriza por dos tipos de ciclos: un patrón urbano de transmisión interhumana cuyo vector es

Aedes aegypti y un ciclo selvático involucrando monos y mosquitos de la selva del género *Haemogogus* y *Sabethes* (Strode, 1951).

En el caso de la transmisión del virus del oeste del Nilo (WNV), la cual tuvo una rápida expansión geográfica hacia las Américas, se encuentran implicados los mosquitos del género *Culex spp.* (Anderson et al., 1999; Lanciotti et al., 1999; Lillibridge et al., 2002).

Para el virus de encefalitis equina Venezolana (VEEV) se encuentran involucrados mosquitos del género *Culex spp.* para la cepa enzoótica (Galindo 1971,1972; Ferro 2003), mientras que para la cepa epizoótica principalmente mosquitos del género *Psorophora y/o Ochlerotatus* (Brault et al., 2004; Kramer y Scherer, 1976).

En el virus de encefalitis Japonesa (JEV), el vector principal es *Culex tritaeniorhynchus* y *Culex gelidus* (Tan et al., 1993), mientras que en el virus chikunguya (CHKV) y zika los principales vectores en África, Asia y recientemente en América son los mosquitos del genero *Aedes* (Paterson, 1964; Tsetsarkin et al., 2007; Vega-Rua et al., 2014; Ciota et al., 2017).

A partir de estudios de vigilancia y monitoreo en mosquitos en zonas donde hay incidencia de arbovirosis se han podido aislar virus por cultivo celular de *Aedes*, *Psorophora*, *Ochlerotatus*, *Culex*, *Culiseta*, *Mansonia* y otros (Aitken et al., 1960; Causey et al, 1961; Tesh, 1979; Anderson et al., 1999; Johansen et al., 2000; Andreadis et al., 2001; O'Guinn et al., 2004; Turrel et al., 2005), implicándolos como los vectores en la transmisión de arbovirus.

Por otro lado, aún no está determinado el ciclo de transmisión y la ecología de transmisión de algunos arbovirus como Chikunguya, O'nyong, entre otros, en determinadas áreas endémicas, por lo que se cree que pueden ser mantenidos en un ciclo enzoótico involucrando varias especies de mosquitos (*Culicidae*) como vectores principales, así como mamíferos o aves como hospederos naturales vertebrados (de Thoisy, 2003; Watts 1997a, 1998; Lourenço-de-Oliveira et al., 2017).

Además, un paso importante en la mantención y diseminación de los arbovirus es la amplificación que ocurre en ciertos hospederos, los cuales en muchos casos no muestran mortalidad frente a la infección. Tal como ocurre en la transmisión del virus de encefalitis equina del Este (EEEV) en Estado Unidos, donde el virus es mantenido en un ciclo enzootico por mosquitos *Culiseta melanura* y aves de la familia passeriformes, siendo en estas aves donde EEEV se encuentra disponible para otras especies de mosquito como *Aedes vexans* y *Coquillettidia perturbans* que actúan como “vectores puente” por su preferencia de alimentación hacia varios hospederos como humano o caballo, que son los hospederos finales del virus (Crans, 1977; Hassan et al., 2003). Esto indica que cuan clave en la ecología de arbovirus es la interacción colateral con aves y/o mamíferos.

II.5 FUENTES DE ALIMENTACIÓN DE MOSQUITOS

Los mosquitos hematófagos se alimentan de un determinado rango de hospederos es decir presentan un patrón de alimentación hacia ciertos vertebrados (Tempelis y Hayes, 1975). Esta característica estaría asociada no sólo por factores genéticos y ecológicos como comportamiento de vuelo, periodicidad de alimentación de mosquitos sino también por un comportamiento oportunista de los vectores de acuerdo con la disponibilidad y densidad de hospederos vertebrados en una determinada área (Reuben et al., 1992; Turell et al., 2005; Molaei et al., 2008).

Los estudios de comportamiento de los vectores sobre sus hospederos en las enfermedades zoonóticas han permitido modelar como el comportamiento del artrópodo, edad, abundancia relativa, estado inmune, competencia de reservorio y tasas de infección contribuyen hacia la transmisión del patógeno (Lord et al., 1996; Kilpatrick et al., 2006; Unnaschet et al., 2006).



Figura 2: *Aedes aegypti* alimentándose de un hospedero humano

De acuerdo a su comportamiento se han podido asociar los vectores con los reservorios naturales de los arbovirus en una zona determinada, tal como ocurre con el mosquito *Culex quinquefasciatus*, el cual es un vector oportunista y fundamental en la transmisión de WNV en Texas (Molaei et al., 2007), mientras que *Culex pipiens* actúa como vector puente de WNV a humanos en Chicago (Hammer et al., 2008).

Culiseta melanura, *C. mortisans*, *Anopheles spp*, son vectores ornitofílicos (preferencia hacia aves) para EEEV en Estados Unidos (Molaei et al., 2006); en tanto *Aedes* es una especie oportunista, con una preferencia de alimentación sobre mamíferos (Tempelis et al., 1970; Sullivan et al., 1971; Savage et al., 1993; Niebylski et al., 1994; Richards et al., 2006). *Aedes aegypti* es un vector antropofílico cuyo patrón de alimentación evoluciona más por circunstancias ambientales (Monath, 1988). *Culex tritaeniorhynchus* se alimenta de sangres acuáticas y mamíferos grandes como el cerdo, al cual transmite y amplifica el virus de encefalitis Japonesa hacia caballos y humanos en Asia (Hurk et al., 2009).

II.6 IDENTIFICACIÓN DE FUENTES DE ALIMENTACIÓN EN MOSQUITOS

Inicialmente se utilizaban diferentes métodos serológicos basados en precipitina, hemaglutinación o ELISA para la identificación del patrón de alimentación de mosquitos (Ogusuku et al., 1994; Boreham, 1975; Gómez et al.,

1998); sin embargo, en muchos casos solo se llegaba a identificar al presunto hospedero a nivel de orden o familia. Además, existía la necesidad de producir anticuerpos específicos contra cada hospedero potencial y la probabilidad de reacción cruzada que ocasionaba falsos positivos (Chow et al., 1993). En la mayoría de los casos solamente el 80% de los mosquitos alimentados colectados reaccionaba con un antisuero determinado, dejando un 20% no identificado (Irby y Apperson, 1988).

Con los avances en tecnología de DNA, la identificación de las fuentes de alimentación en artrópodos hematófagos usando ensayos moleculares se incrementó consistentemente. El uso de tales técnicas permitió además usar las extracciones de DNA del mosquito para múltiples propósitos como la confirmación de especies de mosquitos, determinación del estado de infección por varios patógenos y estudios de genética de poblaciones y filogenia de vectores (Ravel et al., 2001; Harbach, 2007)

Se han desarrollado ensayos moleculares como el heterodúplex, en el cual las secuencias desconocidas son identificadas a través de la movilidad de los productos heterodúplex formados por combinar una sonda conocida y una muestra de DNA desconocida. (Boakye et al., 1999; Apperson et al., 2002, 2004; Lee et al., 2002; Bosseno et al., 2006). Estos ensayos son altamente sensibles. Sin embargo, en caso la sonda es divergente con la muestra desconocida, el ensayo puede fallar para distinguir diferentes patrones de bandas para diferentes hospederos, por lo que se requeriría múltiples sondas para la identificación de varios hospederos implicando un mayor costo.

Los métodos para identificación basados en PCR multiplex y polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP) (Kent y Norris, 2005; Meece et al., 2005) requieren estándares conocidos limitando la identificación de vertebrados por el cual las muestras de DNA han sido obtenidas y los perfiles de restricción desarrollados. Sumado a ello, la dificultad de conseguir suficiente número de muestras de referencias en zonas con alta biodiversidad, donde las fuentes potenciales de alimentación son elevadas. Otros métodos usando una transferencia de hibridización reversa (Abassi et al., 2009) puede evaluar

múltiples muestras al mismo tiempo, e identificar fuentes mixtas de alimentación, sin embargo, requiere el diseño y optimización de nuevas sondas y primers.

Durante los últimos años se ha venido utilizando exitosamente la técnica de PCR (Bataille et al., 1999; Chow et al., 2000; Ansell et al., 2000; deBenedictis et al., 2003). El PCR del gen mitocondrial de *citocromo b* ha permitido identificar los hospederos específicos (Ngo y Kramer, 2003) luego de secuenciar directamente los productos de PCR y compararlos con la información de la secuencia de DNA mitocondrial de los vertebrados disponible en bases de datos de genes (Molaei y Andreadis, 2006; Molaei et al, 2006,2007; Cupp et al, 2004)

El *citocromo b* tiene mucha utilidad para identificar fuentes de alimentación debido al alto número de copias como gen mitocondrial y variación genética en la secuencia dentro de los vertebrados para una segura identificación. La información contenida en este gen ha sido útil para genética de poblaciones, sistemática y para análisis moleculares de filogenia y filogeografía.

En el Perú, la epidemiología de las enfermedades virales (Dengue, Oropouche, fiebre amarilla, encefalomiелitis equina Venezolana, Mayaro, entre otras) transmitidas por mosquitos en la cuenca del Amazonas es poco entendida y desconocida (Turell et al., 2005), así como los ciclos de transmisión y dispersión de virus emergentes y de los nuevos virus circulantes (Aguilar et al, 2011), de los cuales poco se sabe acerca de sus reservorios vertebrados no humanos. Adicionalmente no hay estudios de identificación de fuentes de alimentación de mosquitos asociados a arbovirus en el Perú. Por lo que la identificación del posible patrón de alimentación de los mosquitos en zonas endémicas de arbovirosis hacia ciertos hospederos, y el aislamiento de virus proveniente del mosquito, ayudaría a evaluar la capacidad de transmisión del vector, así como poder predecir el rol de los hospederos en la ecología de los arbovirus en un área determinada del Perú y desarrollar estrategias de control.

Por lo mencionado, la presente tesis considera necesaria la identificación molecular del hospedero–fuente de alimentación en los mosquitos provenientes de la cuenca del Amazonas en el Perú.

III. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Hipótesis

Los mosquitos (*Culicidae*) vectores de la transmisión de arbovirus presentan presentar un patrón de alimentación hacia hospederos naturales de los arbovirus de la zona donde se han dispersado, y pueden ser detectado por el análisis de *citocromo b* de la sangre del hospedero presente en el mosquito.

Objetivos

Objetivo General

- ◆ Identificar las fuentes de alimentación de los mosquitos (*Culicidae*) provenientes de zonas endémicas de arbovirosis en Loreto.

Objetivos Específicos

- ◆ Estandarizar un protocolo de PCR de *citocromo b* para identificar vertebrados.
- ◆ Identificar secuencias de *citocromo b* de los hospederos naturales, que presentan distribución endémica, a partir de la dieta de mosquitos (*Culicidae*) en el Perú.
- ◆ Aislar arbovirus a partir de los mosquitos de zonas endémicas de arbovirosis en Loreto, Perú.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

IV.1 MATERIALES

IV.1.1 Material biológico

IV.1.1.1 Líneas Celulares:

Se usaron las células Vero 76 (células epiteliales de riñón de *Chlorocebus sabaues* “mono verde africano”) y las células C6/36 (células de larva de *Aedes albopictus*), obtenidas del Centro de Investigación Naval Medical Research Unit No 6 (Lima – Perú).

Las células fueron mantenidas con medio mínimo esencial suplementado con 10% de suero bovino fetal inactivado (FBS), L-glutamina, vitaminas, aminoácidos no esenciales (NEEA), piruvato de sodio y antibióticos (Ver anexo 1), y se usaron frascos de 150 cm² para los pasajes de células. Las células Vero 76 y C6/36 fueron subcultivadas para infección usando frascos de 12.5 cm² y placas de cultivo de 24 pozos respectivamente (Ver anexo 2).

IV.1.1.2 Fluido ascítico hiperinmune de ratón:

Los fluidos policlonales para cada una de las semillas virales provinieron de ascitis de ratones hembras inmunizadas con una semilla viral determinada. (Ver anexo 3). Posteriormente se hicieron mezclas de fluidos ascíticos en volúmenes iguales de acuerdo con el grupo viral:

- Flaviviruses: Dengue (DENV), Fiebre amarilla (YFV), San Luis (SLE), oeste del Nilo (WNV)
- Alphaviruses: Encefalitis equina Venezolana (VEEV), Mayaro (MAYV), Encefalitis equina del Este (EEEV).
- Bunyavirus: Oropouche (OROV), Grupo C (GpCV), Guaroa (GUAV), Sin nombre (SNV).
- Arena/EMCV: Tacaribe (TACV), Encefalomiocarditis(EMCV)

IV.1.1.3 Mosquitos

Mosquitos (*Culicidae*) provenientes del Departamento de Loreto.

IV.2 MÉTODOS

IV.2.1 Colecta de especímenes

IV.2.1.1 Descripción del área

Los mosquitos fueron colectados durante los meses de enero a marzo del año 2009 en 6 sitios de estudio de la cuenca del Amazonas perteneciente al Departamento de Loreto, provincias de Datem del Marañón y Alto Amazonas (Figura 3). Los sitios de estudio previamente habían sido monitoreados para estudios de vigilancia de vectores por el Centro de Investigaciones Tropical NAMRU No 6.

- Datem del Marañón: Localidades de Saramiriza (04° 33' 38" S, 077° 24' 57" LO), Puerto América (04° 44' 33" S, 77° 03' 38 LO), Nueva Jerusalén (04° 34' 18" LS, 77° 28' 09" LO) y Yanayacu (04° 33' 19" LS, 77° 28' 24" LO).
- Alto Amazonas: Localidades de Lagunas (05° 13' 34" LS, 75° 40' 27" LO) y Santa Cruz (05° 29' 58" LS, 75° 52' 02" LO)

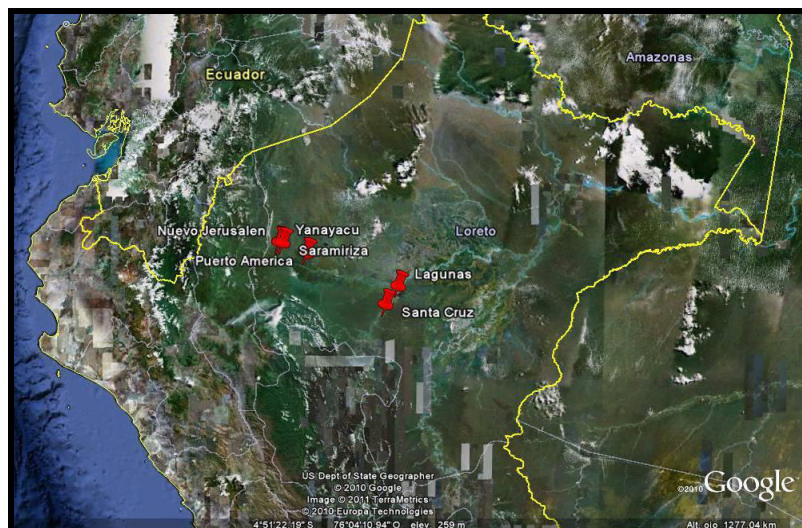


Figura 3: Localización de las áreas de estudio en el Departamento de Loreto-2009.

En los sitios de colecta de mosquitos se observaron algunos animales en áreas intradomiciliarias y peridomiciliarias (Tabla 1).

Tabla 1: Relación de animales observados en cada localidad en áreas intradomiciliarias y peridomiciliarias en Loreto 2009

| LOCALIDAD | AREAS | |
|----------------|--|---------------------------------------|
| | Intradomiciliaria | Peridomiciliaria |
| Saramiriza | Perros, gatos, pollos, pericos, loros, cerdos. | Perros, pollos, patos y caballos. |
| Puerto América | Perros, gatos, pollos | Perros, gatos, pollos, patos, cerdos. |
| Lagunas | Perros, gatos pollos, cerdos. | Perros, cerdos, gallinas, cuyes. |
| Santa Cruz | Perros, gatos, pollos, tucán | Cerdos, patos, gallinas. |

IV.2.1.2 Tipos de Trampas

Se realizaron salidas de campo que consistieron en periodos de 4-16 días. Los mosquitos adultos fueron colectados usando:

- Trampas de luz
- Mochilas aspiradoras (*back packs*)
- Trampas por aspiración manual, usando como trampa cebo humano.

A. Trampas de luz

Los periodos de colecta fueron de 12 horas, iniciadas desde las 18:00 h hasta las 6:00 h del día siguiente. La trampa contenía un equipo de ventilación, un contenedor (copo) y una porta pilas que al ser conectada con la trampa activaba un foco. Estas trampas fueron colocadas en el bosque a unos 100 m aproximados de distancia al camino principal. Una serie de transectos fueron establecidos, y las trampas se suspendieron en los árboles, a una altura aproximada de 3 m del nivel del suelo. Las trampas se recogieron por la mañana y los copos que contenían los mosquitos, se colocaron en envases de tecnopor, cubriendo con papel toalla húmeda y bolsas plásticas. Luego, con una cinta de embalaje, se selló la caja y los mosquitos fueron transportados al laboratorio para su posterior identificación taxonómica.

B. Mochilas aspiradoras

Los periodos de colecta se realizaron desde las 8:00 hasta las 12:45 pm. De acuerdo con el Departamento de Entomología el número de casas muestreadas por localidad fue el siguiente:

Tabla 2: Número de casas /localidad donde se colectaron mosquitos usando mochilas aspiradoras en Loreto 2009

| LOCALIDAD | Nº DE CASAS |
|-----------------------|--------------------|
| Saramiriza | 40 -50 |
| Puerto América | 15 – 20 |
| Lagunas | 150 – 160 |
| Santa Cruz | 40 – 50 |

Las aspiraciones se realizaron por todo el perímetro interno y externo de la casa durante 20 minutos aproximadamente, éstas consistían en aspiraciones por las paredes del domicilio, las habitaciones, las ropas colgadas, los mosquiteros, encima y debajo de las camas. Se aspiró en los alrededores de la cocina: por donde estaban los servicios, los productos de cocina, y la cocina misma. De acuerdo a la cantidad de mosquitos capturados se cambiaba inmediatamente de vaso colector. Usualmente se obtenían de 2 a 3 vasos por casa, y se almacenaban en cajas de tecnopor cubiertas con papel toalla húmeda. Finalmente, las cajas fueron selladas utilizando cinta de embalaje y se transportaron al laboratorio para la respectiva identificación taxonómica de los mosquitos.

C. Trampas por aspiración manual usando cebo humano

Las colectas se realizaron desde las 18:00-21:00 h. Cada colector portaba una linterna de mano, un aspirador manual y 2 copos (envases que albergaban mosquitos). La colecta se realizó en los alrededores del pueblo, y en la periferia del domicilio, se esperaba que los mosquitos se posicionen en el muslo de la pierna del colector para ser capturados. Concluido el tiempo de colecta, los

mosquitos fueron depositados en un envase de tecnopor, acondicionado con toallas húmedas, y sellado para evitar el ingreso de otros artrópodos. Finalmente, los envases de colecta, conteniendo los mosquitos, fueron transportados al laboratorio para la respectiva identificación.

IV.2.2 Identificación taxonómica

La identificación inicial básica morfológica se realizó en el laboratorio del centro de salud cercano al sitio de colecta, mediante el empleo de Trietilamina para inmovilizar a los mosquitos. Posteriormente, los mosquitos fueron colocados en grupos de especímenes en los crioviales de acuerdo a la fecha de colecta, número, tipo de trampa y localidad. Posteriormente, fueron almacenados en un tanque de nitrógeno líquido, y llevados al Laboratorio de Entomología del Centro de Investigaciones de Enfermedades tropicales NAMRU No 6 (Lima-Perú).

La identificación taxonómica final de los mosquitos se realizó sobre una base de hielo seco, de acuerdo con claves taxonómicas según Consoli (1994), a partir de caracteres morfológicos observados a través de un estereoscopio.

Una vez identificados los mosquitos, se procedió a seleccionar los mosquitos de sexo hembra con evidencia de sangre en el abdomen y fueron colocados de manera individual en un tubo de microcentrifuga de 1.5 mL debidamente rotulado. Los tubos se mantuvieron a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ en cajas criogénicas para su posterior extracción de DNA (Figura 4).

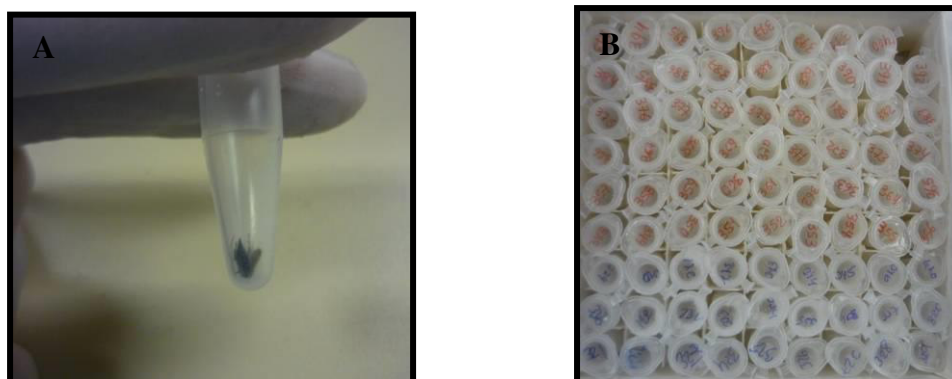


Figura 4: Selección de mosquitos con evidencia de sangre en el abdomen.

(A) Colocados en tubos de 1.5 mL (B) y conservados a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$.

IV.2.3 Estandarización de condiciones

IV.2.3.1 Extracción de DNA a partir de sangre

La estandarización de la extracción de DNA a partir de pequeños volúmenes de sangre se realizó usando muestras de sangre heparinizada que permitan validar posteriormente las pruebas de PCR. Las muestras de sangre correspondieron a *Homo sapiens* “hombre”, *Mus musculus* “ratón”, *Equus caballus* “caballo”, *Canis familiaris* “perro”, *Felis silvestris* “gato”, *Rattus norvegicus* “rata”, *Gallus gallus* “gallina”, *Chelonoidis denticulata* “tortuga”.

Se siguió la metodología de Mackey (1997) con algunas modificaciones:

- En un tubo de microcentrifuga se colocó 2 μL de Polyacryl Carrier y 200 μL de solución de DNAzol BD.
- Posteriormente en cada tubo se agregó un pequeño volumen de sangre heparinizada (1-10 μL), e inmediatamente se mezcló la solución. La mezcla se incubó por 5 minutos a temperatura ambiente.
- Luego, se adicionó 80 μL de isopropanol para precipitar el DNA e inmediatamente se mezcló bien almacenándose 5 minutos a temperatura ambiente
- Se centrifugó a 5000 g por 5 minutos a 4-25 °C. Se decantó el sobrenadante y se dejaron los tubos invertidos durante 3 minutos.
- Para lavar el pellet, se adicionó 750 μL de etanol 95%, se descartó el sobrenadante y nuevamente se adicionó 500 μL de etanol 95%, eliminando el sobrenadante.
- El pellet de DNA obtenido fue solubilizado en 10, 20 y 25 μL de buffer T₁₀E₁ (Tris 10 mM y EDTA 1 mM), y almacenado a -20 °C.

Las muestras de DNA fueron cuantificadas mediante un espectrofotómetro para conocer la concentración en ng/μL.

IV.2.3.2 Reacción en cadena de polimerasa (PCR)

A. PCR de gen de *citocromo b* de aves

Inicialmente se realizó la estandarización del PCR de gen de *citocromo b* de aves (Cicero y Johnson, 2001) (Anexo 4), con el Kit PCR Fast Polimerasa (Roche), usando los controles de DNA (10 ng) de sangre heparinizada extraídos de *Gallus gallus* “gallina” y *Cairina moschata* “pato”, evaluando las temperaturas de alineamiento óptimas para el PCR y concentraciones de mmagnesio (1 mM- 2,5 mM)

B. PCR de gen de *citocromo b* de mamíferos

Se realizó la estandarización del PCR del gen de *citocromo b* de mamíferos (Ngo y Kramer, 2003) (Anexo 4), con el Kit PCR Fast Polimerasa (Roche), usando los controles de DNA de sangre heparinizada extraídos de *Mus musculus* “ratón” (10 ng), evaluando las temperaturas de alineamiento y concentraciones de magnesio (1 mM- 2,5 mM) óptimas para el PCR.

En algunas muestras fue necesario purificar los productos de PCR, y re amplificar usando los mismos sets de primers.

C. PCR de gen de *citocromo b* de reptiles

Se realizó la estandarización del PCR del gen de *citocromo b* de reptiles (Cupp et al., 2004) (Anexo 4), con el Kit PCR Fast Polimerasa (Roche), usando los controles de DNA de sangre heparinizada extraídos de *Chelonoidis denticulata* “tortuga” (10 ng), evaluando las temperaturas de alineamiento de acuerdo a un gradiente y concentraciones de magnesio (1 mM- 2,5 mM) óptimas para el PCR.

IV.2.3.3 Electroforesis de DNA

Los productos del PCR fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa 2% (Anexo 7) a 110 voltios durante 1,2 horas usando un marcador de 100 pb, controles negativos de extracción, controles positivos y blancos (solamente mezcla de PCR).

IV.2.4 Sensibilidad del PCR de *citocromo b*

Una vez estandarizado el PCR, se realizaron diluciones seriadas del DNA extraídos de pato, ratón y tortuga correspondientes a 10 ng, 1 ng, 100 pg, 10 pg y 1 pg y se sometieron a PCR de *citocromo b* para aves, mamíferos y reptiles respectivamente, con la finalidad de determinar la mínima concentración de DNA necesaria para el PCR.

IV.2.5 Rendimiento del PCR de *citocromo b*

El PCR fue validado utilizando DNA apartir de sangre extraída de especies de vertebrados conocidos (domésticos y silvestres), sometiéndolos a amplificación por PCR de *citocromo b* de aves y mamíferos, y posteriormente los productos fueron sometidos al secuenciamiento de DNA.

Las especies de vertebrados fueron: *Homo sapiens* “humano”, *Mus musculus* “ratón”, *Equus caballus* “caballo”, *Canis familiaris* “perro”, *Felix silvestris* “gato”, *Sus scrofa* “cerdo”, *Gallus gallus* “gallina”, *Cairina moschata* “pato”, *Aratinga mitrata* “loro”, *Amazona ochrocephala* “loro”, *Aratinga erythrogenys* “loro”, *Graydidascalus brachyurus* “tordo negro” y *Meleagris gallopavo* “pavo”.

IV.2.6 Extracción de DNA del abdomen de mosquitos con evidencia de sangre

De manera breve, cada mosquito fue disectado individualmente sobre una placa petri estéril, donde se separó el abdomen del cefalotórax (usado para el

aislamiento viral) con un corte mediante la ayuda de estiletes estériles por calor, para evitar la contaminación cruzada (Figura 5).

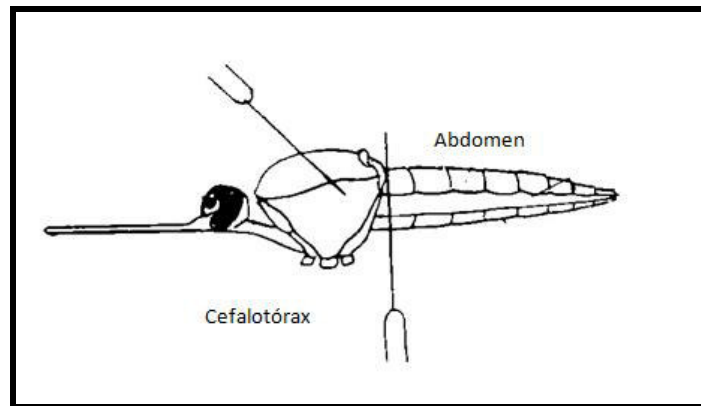


Figura 5: Separación del abdomen del cefalotórax.

- El DNA fue individualmente extraído del contenido abdominal de los mosquitos alimentados mediante el uso de la solución DNA-zol BD (Molecular Research Center, Cincinnati).
- Posteriormente los abdómenes de los mosquitos fueron homogenizados con 250 μ L de DNA-zol BD con el uso de morteros estériles, se mezcló bien y se dejó a temperatura ambiente durante 5 a 10 minutos.
- Se centrifugó a 10000 g por 10 minutos y se transfirió el sobrenadante a otro tubo de 1,5 mL estéril. Luego se adicionó 4 μ L del reactivo Poly acryl carrier al sobrenadante.
- Se agregó 120 μ L de isopropanol frío y mezcló hasta obtener una solución homogénea, se dejó incubar durante 3 minutos a temperatura ambiente.
- Luego se centrifugó a 5000 g por 5 minutos. El pellet obtenido luego de la precipitación se lavó 2 veces con etanol 75%, y se dejó los tubos invertidos hasta que se evaporen los restos de etanol.

- El pellet fue resuspendido en 25-35 μL de buffer T₁₀E₁ estéril y fue almacenado a -20 °C.
- El DNA obtenido fue cuantificado en el espectrofotómetro Nanodrop Thermo Scientific, siguiendo el manual de procedimientos y utilizando como blanco una alícuota del buffer de resuspensión de DNA. Se consideraron 2 medidas de 1 μL por muestra para cada medida en el equipo. Se extrajo DNA de los abdómenes en grupos de 15-20 mosquitos, considerando un control negativo de extracción, para evaluar si existía contaminación entre grupos.

IV.2.7 PCR del gen de *citocromo b* de la sangre presente en el abdomen del mosquito

El DNA aislado de la sangre presente en el abdomen del mosquito, sirvió como molde en las reacciones de PCR. A cada una de las muestras de DNA extraídas se realizó el PCR de *citocromo b* de mamíferos y de aves, de acuerdo con las modificaciones realizadas apartir de los controles. La cantidad de DNA para cada reacción de PCR fue de 100-200 ng.

IV.2.7.1 *Citocromo b* de mamíferos

El producto de PCR esperado para el gen de *citocromo b* de mamíferos fue de 772 pb. Se utilizó el kit Fast Start Taq Polimerasa, y los siguientes componentes (Tabla 3).

Tabla 3. Componentes utilizados en el PCR de *citocromo b* de mamíferos

| Reactivos | 1Rx |
|--|--------------------|
| Primer Mamífero Forward 10 μM | 5 μL |
| Primer Mamífero Reverse 10 μM | 5 μL |
| Buffer 10X con MgCl_2 25 mM | 5 μL |
| dNTPs 1 mM | 1 μL |
| H ₂ O | 28,6 μL |
| Taq polimerasa 5U/ μL | 0,4 μL |
| DNA | 5-4 μL |
| Volumen final | 50 μL |

Las condiciones del PCR fueron las siguientes:

| | | |
|-----------------------|------------|-------------------|
| 95 °C x 10´ | | Desnaturalización |
| 94 °C x 30´´ | } 36ciclos | Desnaturalización |
| 58 °C x 45´´ | | Hibridización |
| 72 °C x 1´30´´ | | Polimerización |
| 72 °C x 7´ | | Extensión final |
| Incubación final 4 °C | | |

IV.2.7.2 Citocromo b de aves

El producto de PCR esperado para el gen fue de 580 pb. Se utilizó el kit Fast Start Taq Polimerasa y los primers de *citocromo b* de aves, con los siguientes componentes (Tabla 4).

Tabla 4. Componentes utilizados en el PCR de *citocromo b* de aves

| Reactivos | 1Rx |
|--|---------|
| Primer Aves Forward 10 µM | 5 µL |
| Primer Aves Reverse 10 µM | 5 µL |
| Buffer 10X con MgCl ₂ 25 mM | 5 µL |
| dNTPs 1 mM | 1 µL |
| H ₂ O | 28,6 µL |
| Taq polimerasa 5U/ µL | 0,4 µL |
| DNA | 5-4 µL |
| Volumen final | 50 µL |

Las condiciones del PCR fueron las siguientes:

| | | |
|-----------------------|-------------|-------------------|
| 95 °C x 5 minutos | | Desnaturalización |
| 94 °C x 30 segundos | } 36 ciclos | Desnaturalización |
| 53 °C x 50 segundos | | Hibridización |
| 72 °C x 40 segundos | | Polimerización |
| 72 °C x 7 minutos | | Extensión |
| Incubación final 4 °C | | |

IV.2.7.3 Citocromo b de reptiles

Para aquellas muestras que no dieron amplicones con los primers de *citocromo b* de aves y mamíferos, se utilizaron otro set primers que amplifican parcialmente secuencias de *citocromo b* de reptiles.

El producto de PCR esperado fue de 280 pb. Se utilizó el kit Fast Start Taq Polimerasa, con los siguientes componentes (Tabla 5).

Tabla 5. Componentes utilizados en el PCR de *citocromo b* de reptiles

| Reactivos | 1Rx |
|--|--------------|
| Primer Forward 10 μ M | 2,5 μ L |
| Primer Reverse 10 μ M | 2,5 μ L |
| Buffer 10X con MgCl ₂ 25 mM | 2,5 μ L |
| dNTPs 1 mM | 0,5 μ L |
| H ₂ O | 14,3 μ L |
| Taq polimerasa 5U/ μ L | 0,2 μ L |
| DNA | 5-4 μ L |
| Volumen final | 25 μ L |

Las condiciones del PCR fueron las siguientes:

| | | |
|-----------------------|-------------|-------------------|
| 95 °C x 2 minutos | } 55 ciclos | Desnaturalización |
| 94 °C x 45 segundos | | Desnaturalización |
| 50 °C x 50 segundos | | Hibridización |
| 72 °C x 1 minuto | | Polimerización |
| 72 °C x 7 minutos | | Extensión Final |
| Incubación final 4 °C | | |

Algunos productos de PCR obtenidos con intensidad tenue de la banda durante la electroforesis, fueron purificados a través de las columnas de purificación de PCR Wizard SV Gel (Promega), para su posterior reamplificación con el set de primers de *citocromo b* respectivo.

IV.2.8 Secuenciamiento

Los productos de PCR fueron usados como molde en la reacción de secuenciamiento para ello se siguió la metodología de secuenciamiento de acuerdo con el kit BigDye® Terminator v3,1 Cycle Sequencing y luego fueron sometidos al secuenciador ABIprism. Los productos de PCR purificados fueron secuenciados con los mismo primers de *citocromo b* (forward y reverse) ya sea ave, mamífero o reptil. Se siguió la reacción mencionada en la Tabla 6.

Tabla 6. Reacción de secuenciamiento de DNA

| Reactivos | 1Rx |
|------------------------------|-------|
| Big Dye Terminator | 4 µL |
| Primer | 1 µL |
| Buffer 5X Big Dye Terminator | 4 µL |
| H2O | 9 µL |
| Templado (Producto de PCR) | 2 µL |
| Volumen final | 20 µL |

Las condiciones de secuenciamiento fueron las siguientes:

| | | |
|-----------------------|-------------|-------------------|
| 95 °C x 1 minuto | } 25 ciclos | Desnaturalización |
| 95 °C x 10 segundos | | Desnaturalización |
| 50 °C x 15 segundos | | Hibridización |
| 60 °C x 4 minutos | | Polimerización |
| Incubación final 4 °C | | |

Cada una de las secuencias obtenidas, fueron analizadas, editadas con el software Sequencher (Gene Codes Co., Ann Arbor, MI) o Bioedit 7.0.9, y comparadas posteriormente con la base de datos del Genbank con el programa BLAST del NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) para identificar al espécimen u hospedero como fuente de alimentación para cierta especie de mosquito. Las secuencias obtenidas de cada mosquito se consideraron identificadas si eran > 91% de identidad (% identidad de nucleótidos) a una secuencia del Genbank para gen de *citocromo b*.

Si la secuencia en estudio tuvo un porcentaje de identidad > al 95% para más de una especie (ambigüedad) en el Genbank, se consideraron datos del rango geográfico de los taxos que permitan una identificación con mayor seguridad.

IV.2.9 Análisis Filogenético para secuencias de *Proechimys*

Se realizó el alineamiento de las secuencias obtenidas de mosquitos alimentados de *Proechimys spp* con las secuencias del banco de genes y de la base de datos de *Proechimys spp* de Sudamérica, provenientes del Museo de Zoología de Vertebrados de la Universidad de California, Berkeley, usando el programa ClustalX 2.0.11 (Larkin 2007).

Las secuencias fueron analizadas con el Programa PAUP 4.0 (test versión 4.0b 10—Swofford 2002) de acuerdo con el método de Máxima Parsimonia y los tipos de sustitución fueron evaluados con una misma probabilidad bajo una búsqueda heurística con adición de 10 secuencias aleatorias, comenzando los arboles por simple adición y reconexión de las ramas. Los clados fueron evaluados por análisis de bootstrap (Felsenstein, 1985) con 100 réplicas para los análisis de Máxima Parsimonia. La topología resultante fue graficada con los programas el TreeView (win32) y FigTree v1.4.0.

IV.2.10 Aislamiento viral por cultivo de células

Los arbovirus presentes en una muestra (suspensión viral, suero, tejido y/o mosquitos) en general, se replican de manera adecuada en cultivo de células C6/36 Y Vero 76, ocasionando en algunos casos efecto citopático (EPC) sobre las células como desprendimiento de las células de la monocapa por muerte celular y alteraciones en la morfología celular.

Para realizar el ensayo de aislamiento viral, se siguió el manual de procedimientos de seguridad, (del inglés Safety Operational Procedures (SOP)), del Centro de Investigaciones de Enfermedades Tropicales NAMRU No6 Lima – Perú:

- El cefalotórax (cabeza y tórax) de cada mosquito (n = 125) fueron homogenizadas con una perla de tungsteno de 3 mm en 1 mL de medio de mantenimiento (EMEM-2% FBS), durante 2 minutos a 30 ciclos por segundo. Posteriormente se centrifugó a 8000 rpm por 7 minutos a 4 °C, recuperándose el sobrenadante (sin tocar el pellet) y fue transferido a un nuevo tubo de 2 mL (criovial). Se realizaron pools de sobrenadante (n = 37) tomando en consideración la especie, localidad, fecha de colecta y tipo de trampa.
- Se removió el medio sobrenadante de cada uno de los flask T-12,5 cm² cultivo y de las placas de 24 pozos, las cuales contenían células en monocapa de Vero 76 y C6/36 respectivamente.
- Luego, se inoculó 200 µL del sobrenadante individual o grupal sobre los frascos T-12,5 cm² de células Vero 76. En caso de las células C6/36 se inoculó 100 µL por duplicado. Solamente las células C6/36 se centrifugaron por 30 minutos a 2000 rpm a 33 °C luego de la inoculación.
- Posteriormente se dejó incubar las células C6/36 y Vero 76 por 1 hora a 33 °C y 37 °C respectivamente. Se consideraron además controles de células en ambos tratamientos y controles positivos infectados con Dengue virus en ambos sistemas de cultivo.
- Finalmente se adicionó 1 mL de medio mantenimiento a cada uno de los pozos de las placas y 3 mL a los flask T-12,5 cm², para su posterior incubación durante 10-14 días, monitoreando la presencia o ausencia de efecto citopático diariamente (Figura 6)

Se realizaron 2 pasajes adicionales en ambas líneas celulares de cada uno de los pools de los mosquitos evaluados. En total se realizaron 3 pasajes de cada pool de mosquitos.

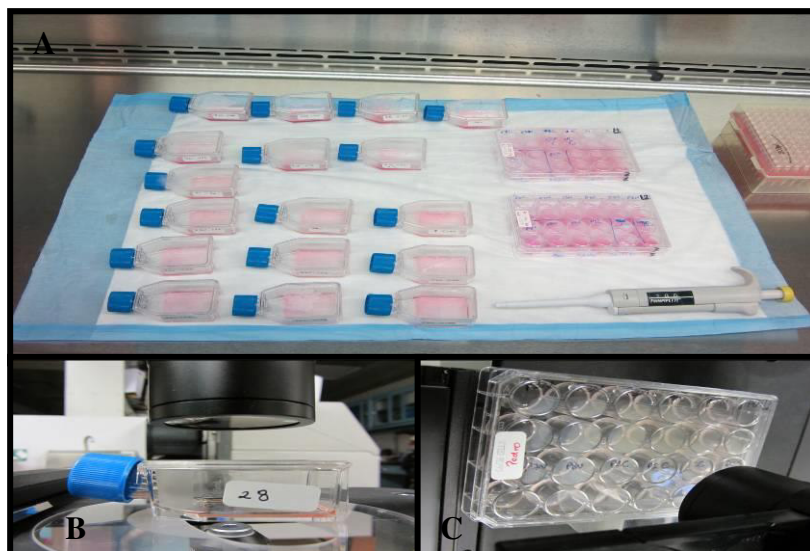


Figura 6: Aislamiento viral por cultivo de células a partir de mosquitos. **(A)** Células C6/36 y Vero 76 previas a la infección **(B)** Monitoreo de efecto citopático en células Vero 76 y **(C)** en células C6/36.

IV.2.11 Cosecha viral y fijación de las células infectadas

Se siguió la metodología para la cosecha viral, de acuerdo con el manual de procedimientos de seguridad, (del inglés Safety Operational Procedures (SOP)), del Centro de Investigaciones de Enfermedades Tropicales NAMRU-6 Lima - Perú, área de arbovirus (2011), para la detección de arbovirus.

- Las células Vero 76 y las células C6/36 infectadas con las muestras fueron usadas y fijadas con el objetivo de detectar antígeno viral a través del inmunoensayo de Inmunofluorescencia indirecta.
- La monocapa de células y el sobrenadante (3 mL para células Vero 76 y 1 mL para células C6/36) fue removida mediante un hisopo estéril y una pipeta de transferencia estéril respectivamente. Un mililitro de cada suspensión fue colocado en un tubo estéril individualmente por muestra, mientras que otra alícuota de la suspensión celular fue inoculada nuevamente en las líneas celulares de acuerdo con el protocolo mencionado en aislamiento viral para los pasajes sucesivos (pasaje 2 y pasaje 3).

- Se centrifugó los tubos por 10 minutos, 2000 rpm a 5°C, y posteriormente el pellet fue resuspendido en 0,8 mL de 1x PBS estéril (Buffer fosfato salino) y sometido al vortex. Los controles positivos (células infectadas con el virus del Dengue) y negativos (células no infectadas) fueron sometidos del mismo modo.
- Los pellets obtenidos de cada suspensión celular C6/36 y Vero 76 fueron dispuestos en una lámina de 24 pozos, la mitad con células C6/36 y la otra mitad con células Vero 76. Es decir, a las 2 primeras filas (8 pozos) se adicionó, con una pipeta de transferencia estéril, aproximadamente 20 µL del pellet resuspendido de cada cultivo celular (Figura 7). A la tercera fila (4 pozos) se adicionó el control de cada línea celular (células no infectadas).

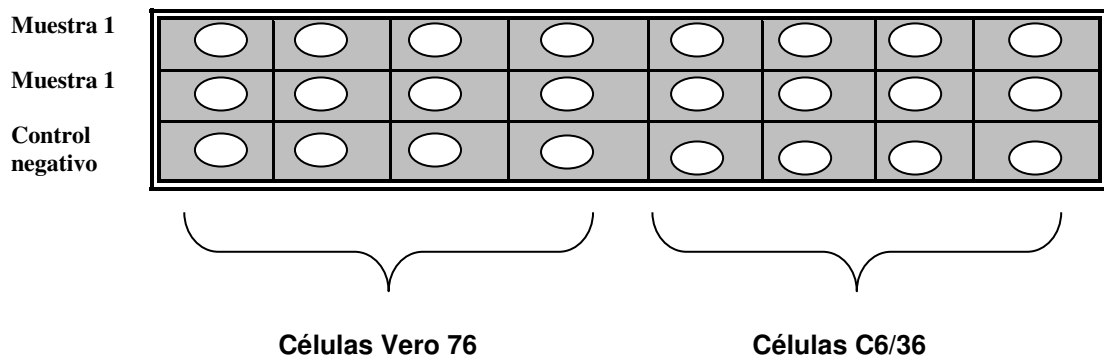


Figura 7. Distribución de los pellets de células C6/36 y Vero 76 de una muestra infectada (Muestra 1) en la lámina de 24 pozos. Controles negativos son células C6/36 y Vero 76 no infectadas.

- Posteriormente se dejaron secar las láminas dentro de la cámara de flujo laminar toda la noche. Una vez secas las láminas fueron fijadas en una solución de acetona fría (-20°C) durante 15 minutos y almacenadas a -80°C para el posterior ensayo de inmunofluorescencia indirecta.

IV.2.12 Inmunofluorescencia indirecta (IFI)

La Inmunofluorescencia indirecta usa 2 anticuerpos: el anticuerpo primario que reconoce a la molécula blanco, y el anticuerpo secundario ligado a una

sustancia fluorescente: isotiocianato de fluoresceína (FITC) que reconoce al anticuerpo primario. Esta reacción inmunológica es específica.

Para el desarrollo de la Inmunofluorescencia indirecta se utilizan cultivos celulares infectados con una muestra determinada (suero, sobrenadantes de mosquitos, suspensiones virales, etc.) sobre la que se desea comprobar si existen antígenos virales en las células infectadas, que se unan a los anticuerpos primarios o fluidos ascíticos hiperinmunes de ratón (HMAF) dirigidos a un arbovirus específico. La unión se visualiza tras la adición de un conjugado anti-inmunoglobulina marcado con isotiocianato y la posterior observación en el microscopio de fluorescencia (Figura 9).

Se desarrolló la metodología para identificar virus obtenidos de la cosecha de cultivos virales, a partir del Manual de procedimientos de seguridad, (del inglés Safety Operacional Procedures (SOP)), del Centro de Investigaciones de Enfermedades Tropicales NAMRU-6 Lima - Perú, área de arbovirus (2011).

- Los grupos de fluidos ascítico hiperinmune de ratón: Flavivirus, Alphavirus, Bunyavirus, Arena/EMCV (anticuerpos primarios), fueron homogenizados y posteriormente 10 µL de cada grupo fue adicionado a cada columna (Figura 8).

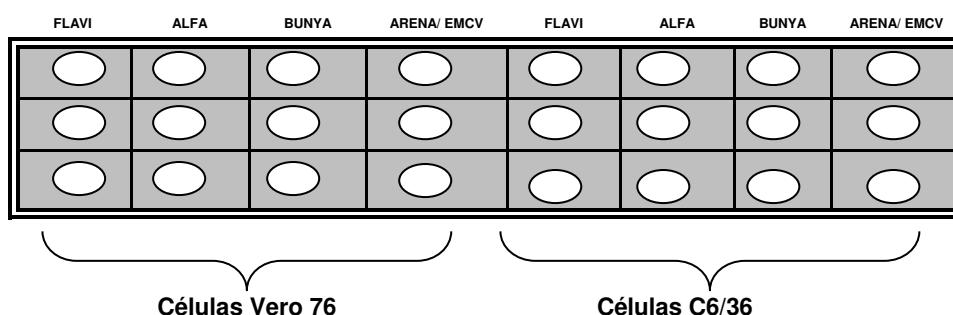


Figura 8: Distribución de los fluidos ascíticos hiperinmunes de ratón (FLAVI, Flavivirus; ALFA, Alfavirus; BUNYA, Bunyavirus; ARENA/EMCV, Arenavirus/ Encefalomiocarditis) en la lámina de 24 pozos para la prueba de IFI.

- Las láminas fueron incubadas a 37 °C por 1 hora. Posteriormente se retiró el fluido ascítico a través de succión por vacío de los pozos. Se lavaron 2

veces las láminas por inmersión en PBS 1X durante 5 minutos, y luego se secaron las láminas.

- Una vez secas las láminas, se adicionó 10 μ L del conjugado isotiocianato de fluoresceína (FITC) (1:100, azul de Evans 1:33, diluido en PBS 1X), a todos los pozos de la lámina. Se dejó incubar 1 hora, para luego lavar 2 veces en PBS 1X por 5 minutos.
- Finalmente se adicionaron unas gotas de glicerol a la superficie de la lámina y se cubrió con un cubreobjetos. Las láminas fueron envueltas con papel platino por 15 minutos y luego observadas a 200x de magnificación en el microscopio de fluorescencia.

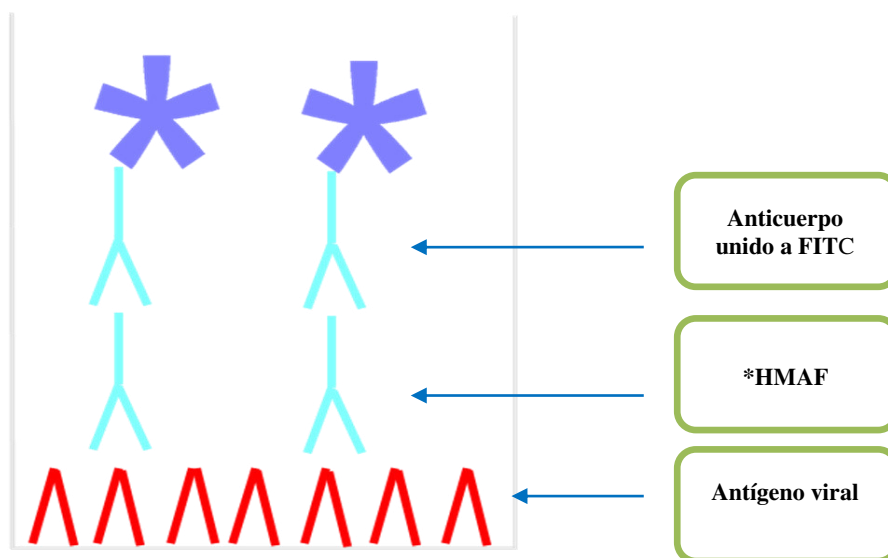


Figura 9: Representación esquemática de la Inmunofluorescencia indirecta para la detección de antígenos virales en las células infectadas. * HMAF (fluidos ascíticos hiperinmunes de ratón)

IV.2.13 Extracción de RNA

Se realizó la extracción de RNA de los cultivos celulares con ligero efecto citopático usando el kit de extracción de RNA viral QIAamp® de Qiagen, siguiendo el procedimiento del manual de procedimientos de seguridad del Centro de Investigaciones de Enfermedades Tropicales NAMRU-6 (Anexo 5).

IV.2.14 Reacción en cadena de la polimerasa de arbovirus

IV.2.14.1 Flavivirus

Se siguió la metodología de PCR de Flavivirus desarrollado por Kuno et al., 1998, para detectar genomas de Flavivirus, con algunas modificaciones. Este método involucra 2 pasos. El primer paso es una reacción combinada de: 1) transcripción reversa de genoma RNA de Flavivirus hacia cDNA usando el primer cFD3 anti sentido específico a Flavivirus y 2) PCR del cDNA resultante usando los primers FU1 y CFD3. Este paso es llamado RT-PCR. Los productos de RT-PCR son luego amplificados en un segundo paso conteniendo 2 primers: FU1 y cFD2, este paso es llamado Nested PCR y produce un amplicón de 265 pb.

Primers usados para amplificar Flavivirus:

| | | Posición en el genoma |
|-----------------|------------------------------------|-----------------------|
| FU1 (F) | TAC AAC ATG ATG GGA AAG AGA GAG AA | 8993 |
| cFD3 (R) | AGC ATG TCT TCC GTG GTC ATC CA | 10077 |
| cFD2 (R) | GTG TCC CAG CCG GCG GTG TCA TCA GC | 9258 |

A. RT-PCR

La transcripción reversa y el PCR (RT-PCR) fueron ejecutados en una sola reacción, como se muestra en la tabla 7.

Tabla 7. Reactivos utilizados en la reacción de RT-PCR de Flavivirus

| Reactivos | 1Rx |
|---|----------|
| 5X PCR buffer (w/MgCl ₂ 75 mM) | 10 µL |
| 2.5 mM dNTPs | 4 µL |
| MgCl ₂ 25 mM | 2 µL |
| 10 pmol/µL primer FU1 | 3 µL |
| 10 pmol/µL primer cFD3 | 3 µL |
| 1 M DTT | 0,25 µL |
| AMV transcriptasa reversa | 0,5 µL |
| Taq Polimerasa (Promega 5U/µL) | 0,5 µL |
| H ₂ O | 16,75 µL |
| RNA | 10 µL |
| Volumen final | 50 µL |

Las condiciones del RT-PCR fueron las siguientes:

| | | |
|-----------------------|-------------|---------------------------|
| 45° C x 60 minutos | } 32 ciclos | Transcripción reversa |
| 95° C x 2 minutos | | Inactivación de la enzima |
| 94° C x 30 segundos | | Desnaturalización |
| 52° C x 40 segundos | | Hibridización |
| 68° C x 2 minutos | | Polimerización |
| 68° C x 10 minutos | | Extensión |
| Incubación final 4° C | | |

B. Nested PCR

El producto de RT-PCR fue diluido 1:100 en agua libre de nucleasas (2 µL producto + 198 µL agua). La dilución (5 µL) fue usada como molde en la reacción Nested-PCR (Tabla 8).

Tabla 8. Reactivos utilizados en la reacción Nested PCR de Flavivirus

| Reactivos | 1 Rx |
|---|---------|
| 5X PCR buffer (w/MgCl ₂ 75 mM) | 10 µL |
| 2.5 mM dNTPs | 4 µL |
| 10 pmol/µl primer FU1 | 3 µL |
| 10 pmol/µl primer cFD2 | 3 µL |
| Taq Polimerasa (Promega 5U/µL) | 0,3 µL |
| Agua libre de nucleasas | 24,7 µL |
| Producto de RT-PCR (1:100) | 5 µL |
| Volumen final | 50 µl |

Las condiciones del PCR fueron las siguientes:

| | | |
|-----------------------|-------------|-------------------|
| 95 °C x 2 minutos | } 14 ciclos | Desnaturalización |
| 94 °C x 30 segundos | | Desnaturalización |
| 58 °C x 50 segundos | | Hibridización |
| 68 °C x 1 minuto | | Polimerización |
| 68 °C x 10 minutos | | Extensión Final |
| Incubación final 4 °C | | |

Los productos del Nested PCR fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa 2% (Anexo 7) usando un marcador de 100 pb. La corrida electroforética se realizó a 110 voltios durante 1.2 horas. El control positivo de Flavivirus (Virus del Dengue serotipo 4) produjo un amplicón de 265 pb. El control negativo fue RNA extraído de células no infectadas.

IV.2.14.2 Alfavirus

El PCR de Alfavirus genérico desarrollado por Pfeiffer 1997, para detectar el gen de la proteína no estructural 1 (NS1) de los Alfavirus, fue modificado de acuerdo con el Manual de Procedimientos de NAMRU-6.

Este método involucra 2 pasos. El primer paso es una reacción de transcripción reversa de genoma RNA de Alfavirus hacia cDNA usando el primer cM3W anti sentido específico a Alfavirus. El segundo paso consistió en un PCR del cDNA resultante, usando los primers cM3W y M2W. Un resultado positivo produce un amplicón de 434 pb.

Primers usados para amplificar Alfavirus:

M2W (Forward): YAG AGC DTT TTC GCA YST RGC HW

cM3W (Reverse): ACA TRA ANK GNG TNG TRT CRA ANC CDA YCC

A. Transcripción Reversa (RT)

La transcripción reversa (RT) se realizó incubando inicialmente el RNA con el primer antisentido cM3W, y luego adicionando las enzimas transcriptasa reversa y el inhibidor de RNAasas, de acuerdo a la tabla 9.

Tabla 9. Reactivos utilizados en la transcripción reversa de Alfavirus

| Reactivos | 1Rx |
|----------------------------------|---------------|
| Primer RT-cM3W (5 pmol/ μ L) | 7,7 μ L |
| RNA | 5,0 μ L |
| | |
| Mezcla de Enzimas | |
| RT-Buffer | 8,0 μ L |
| Super Script III | 0,35 μ L |
| Rnasin Inhibidor | 0,8 μ L |
| Volumen final | 21,85 μ L |

Las condiciones de la transcripción reversa fueron las siguientes:

| | |
|-----------------------|---------------------------|
| 70 °C x 5 minutos | Desnaturalización RNA |
| 20 °C x 1 minuto | Hibridización |
| 45 °C x 60 minutos | Transcripción reversa |
| 95 °C x 5 minutos | Inactivación de la enzima |
| Incubación final 4 °C | |

B. PCR

El cDNA obtenido de la reacción de RT fue sometido a la reacción de PCR usando los primers de Alfavirus genéricos:

Tabla 10. Reactivos utilizados en la reacción de PCR de Alfavirus

| Reactivos | 1Rx |
|---|-------------|
| Primer Mix M2W-cM3W (1,5 pmol/ μ L) | 30 μ L |
| 1X PCR Buffer | 8,6 μ L |
| MgCl ₂ (25 mM) | 1,1 μ L |
| Enzima GoTaq (5 U/ μ L) | 0,3 μ L |
| cDNA producto | 10 μ L |
| Volumen final | 50 μ L |

Las condiciones del PCR fueron las siguientes:

| | | |
|-----------------------|-------------|---------------------------|
| 95°C x 3 minutos | | Desnaturalización inicial |
| 94°C x 2 minutos | | Desnaturalización |
| 50°C x 4 minutos | | Hibridización |
| 72 °C x 4minuto | | Polimerización inicial |
| 94 °C x 20 segundos | } 40 ciclos | Desnaturalización |
| 50 °C x 30 segundos | | Hibridización |
| 72 °C x 1minuto | | Polimerización |
| 72 °C x 10 minutos | | Extensión final |
| Incubación final 4 °C | | |

Los productos del PCR fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa 2% (Anexo 7) usando un marcador de 100 pb, y la corrida electroforética se realizó a 110 voltios durante 1,2 horas, El control positivo de Alfavirus (Virus de encefalitis equina venezolana) produjo un amplicón de 434 pb, El control negativo fue RNA extraído del control de células no infectadas,

Los amplicones obtenidos en los PCR de Flavivirus o Alfavirus, fueron sometidos a la reacción de secuenciamiento usando los primers genéricos de PCR de cada grupo viral y siguiendo la metodología de secuenciamiento anteriormente mencionada.

IV.RESULTADOS

V.1 Estandarización de condiciones

V.1.1 Extracción y cuantificación de DNA

El DNA de vertebrados fue extraído a partir de 1 μL de sangre con el anticoagulante ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), según las modificaciones en la metodología de Mackey et al., 1998 realizadas en la presente tesis. Las muestras de vertebrados fueron: *Canis familiaris* “perro”, *Equus caballus* “caballo”, *Felis catus* “gato”, *Mus musculus* “ratón”, *Homo sapiens* “humano”, *Gallus gallus* “pollo”, *Meleagris gallopavo* “pavo” y *Cairina moschata* “pato”.

El DNA extraído fue cuantificado mediante el espectrofotómetro Nanodrop Thermo Scientific, obteniéndose la concentración de DNA/ μL de sangre extraída de cada especie de vertebrado mencionada anteriormente (Tabla 11).

Tabla 11. Cantidad de DNA (ng) obtenida por μL de sangre con anticoagulante de aves y mamíferos peridomésticos. Promedio \pm DS, (n=3)

| Especies | ng DNA/ μL sangre \pm DS |
|-----------------------------------|---------------------------------------|
| Aves | |
| <i>Gallus gallus</i> “gallina” | 500 \pm 25 |
| <i>Meleagris gallopavo</i> “pavo” | 470 \pm 42,1 |
| <i>Cairina moschata</i> “pato” | 385 \pm 7,1 |
| Mamíferos | |
| <i>Canis familiaris</i> “perro” | 110 \pm 10,6 |
| <i>Homo sapiens</i> “humano” | 100 \pm 8,6 |
| <i>Mus musculus</i> “ratón” | 92,5 \pm 10,6 |
| <i>Equus caballus</i> “caballo” | 61,2 \pm 9,6 |
| <i>Felis catus</i> “gato” | 37,5 \pm 3,5 |

De ello se pudo calcular aproximadamente que por cada 1 μL de sangre de *Gallus gallus* “gallina”, *Cairina moschata* “pato”, *Meleagris gallopavo* “pavo” se obtuvo entre 385-500 ng de DNA, mientras que por cada 1 μL de sangre de

mamíferos (humano, perro, ratón, caballo, gato) se obtuvo entre 37-110 ng de DNA.

V.1.2 PCR de *citocromo b* de mamíferos

Se utilizó como controles de DNA las muestras de sangre de mamíferos extraídas previamente, e inicialmente se siguieron las condiciones de PCR según Ngo y Kramer (2003).

Se evidenció en la electroforesis de los productos de PCR un contraste (background) considerable, obtenido usando como moldes DNA de perro, gato y caballo. Los amplicones obtenidos fueron de alrededor 780 pb (Figura 10).

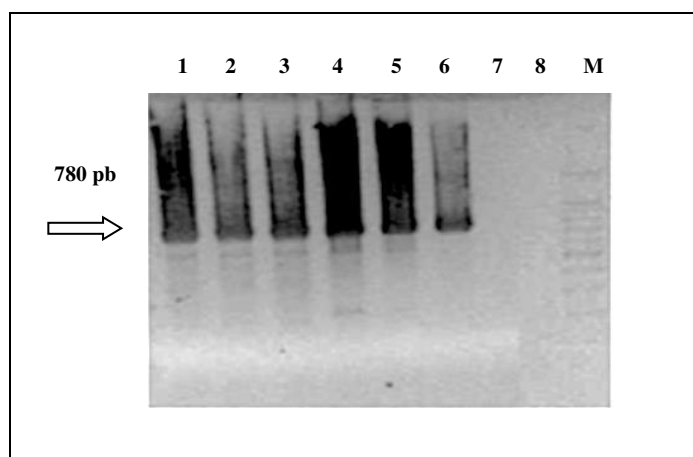


Figura 10. PCR de *citocromo b* de mamíferos. Línea 1-3, DNA de perro (10 ng, 5 ng, y 1 ng); Línea 4 y 5, DNA de caballo (10 ng y 5 ng); línea 6, DNA de gato (5 ng); Línea 7, control de extracción (negativo); línea 8, blanco de PCR. M, marcador de 100pb.

Siendo necesario optimizar algunos parámetros del PCR, como la temperatura de alineamiento de los primers y la concentración de $MgCl_2$ para la polimerización óptima de la enzima Fast Start Polimerasa.

V.1.2.1 Gradiente de MgCl₂

Se realizó un gradiente de concentraciones desde 1 mM hasta 2,5 mM de MgCl₂, usando 10 ng de DNA de perro, evidenciándose una mayor amplificación a partir de 2,0 mM de MgCl₂ (Figura 11).

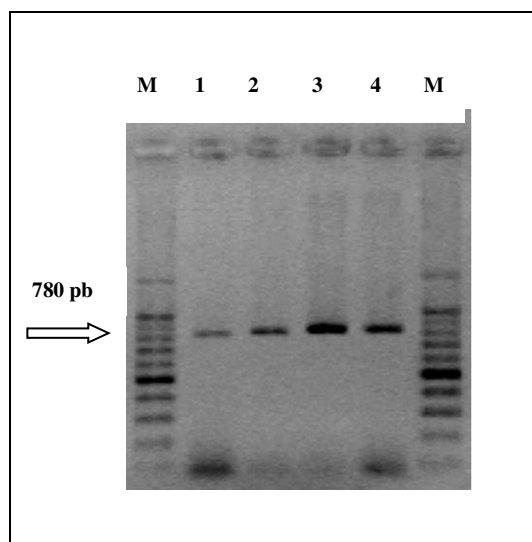


Figura 11. Gradiente de MgCl₂ para el PCR de *citocromo b* de mamíferos. Línea 1, 1 mM MgCl₂; línea 2, 1,5 mM MgCl₂; línea 3, 2 mM MgCl₂; línea 4, 2,5mM MgCl₂. M, marcador de 100pb.

V.1.2.2 Gradiente de temperaturas de alineamiento

Los resultados del gradiente de temperaturas de alineamiento considerando un rango entre 48 °C -64 °C evidenciaron una mayor intensidad del amplicón a 55 °C, usando 10 ng de DNA de perro (Figura 12).

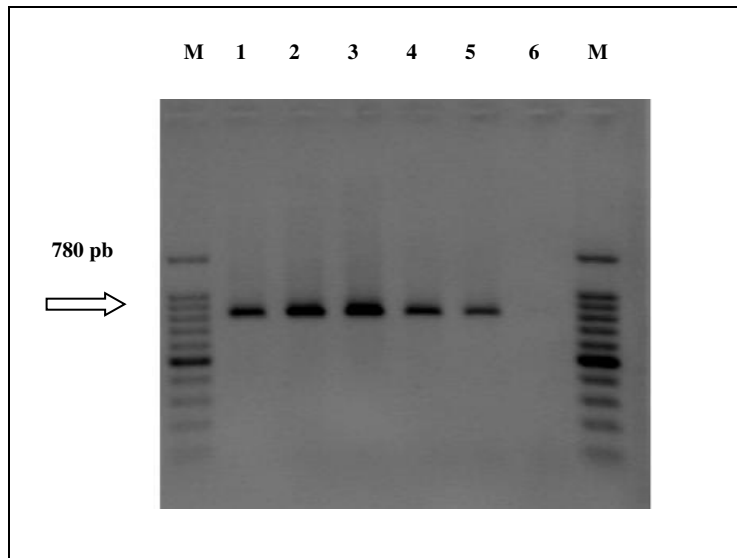


Figura 12. Gradiente de temperaturas de alineamiento para el PCR de *citocromo b* de mamíferos. Línea 1, 48 °C; línea 2, 52°C; línea 3, 55 °C; línea 4, 58°C; línea 5, 60 °C; línea 6, 64 °C. M, marcador de 100 pb.

Finalmente, se realizó un PCR con muestras de DNA de ratón y perro a 58°C de temperatura de alineamiento y 2 mM de MgCl₂ (Figura 13), para evitar el incremento de dímeros y background en los amplicones de 780 pb.

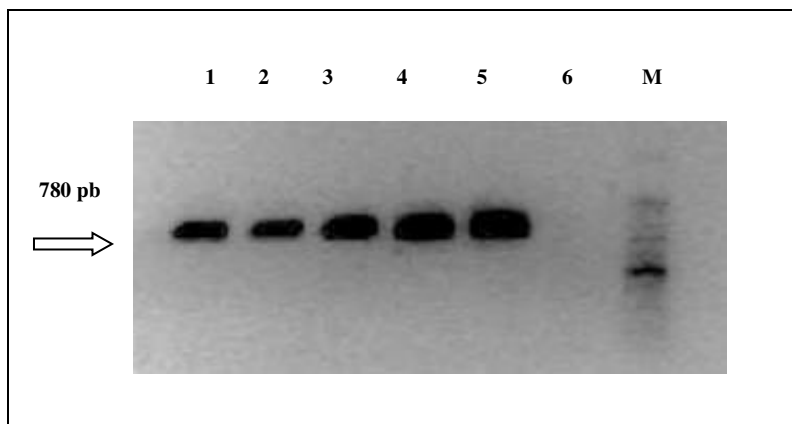


Figura 13. PCR de *citocromo b* de mamíferos con optimización de parámetros. Línea 1 y 2 DNA de perro (10 ng); línea 3-5 DNA de ratón (5 ng, 10 ng y 15 ng); línea 6, blanco de PCR. M, marcador de 100 pb.

V.1.3 PCR de *citocromo b* de aves

Se utilizó como controles, 10 ng de DNA de gallina y pato para optimizar las condiciones de PCR.

V.1.3.1 Gradiente de MgCl₂

Se evidenció amplificación a partir de 2 mM de MgCl₂, siendo más intensa a 2,5 mM de MgCl₂ (Figura 14).

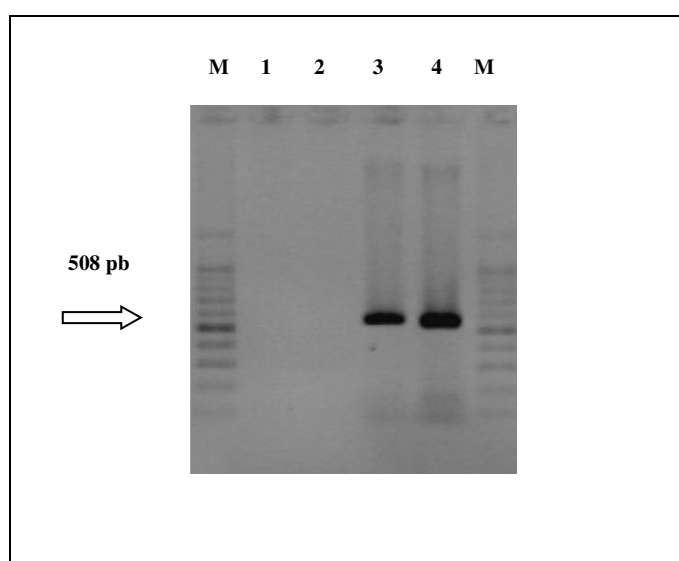


Figura 14. Gradiente de MgCl₂ para el PCR de *citocromo b* de aves. Línea 1, 1 mM MgCl₂; línea 2, 1,5 mM MgCl₂; línea 3, 2 mM MgCl₂; línea 4, 2,5mM MgCl₂. M, marcador de 100 pb.

V.1.3.2 Gradiente de temperaturas de alineamiento

Se realizó el gradiente para cada uno de los 2 controles de DNA (gallina y pato) a diferentes temperaturas de alineamiento (45 °C- 58 °C).

En el caso de la muestra de DNA de gallina se pudieron observar 2 bandas: una superior de 508 pb y otra inferior de alrededor de 280 pb, siendo el producto de PCR ligeramente más intenso y menores inespecificidades a 53 °C, en comparación de las demás temperaturas de alineamiento (Figura 15).

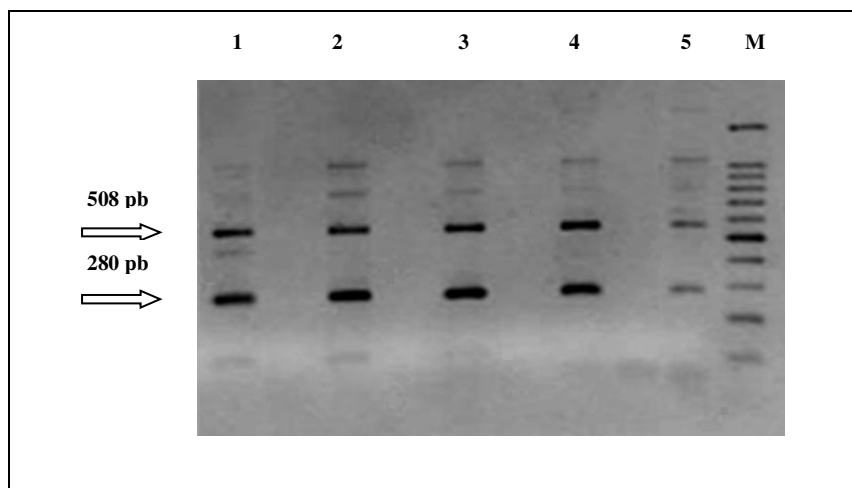


Figura 15. PCR en gradiente de *citocromo b* de aves a partir de muestras de sangre de gallina. Línea 1, 45°C; línea 2, 48 °C; línea 3, 50 °C; línea 4, 53 ° C; línea 5, 55 ° C. M, marcador de 100 pb.

En el caso de la muestra de sangre de pato se evidenció la banda de 508 pb, más intensa a 53 °C (Figura 16).

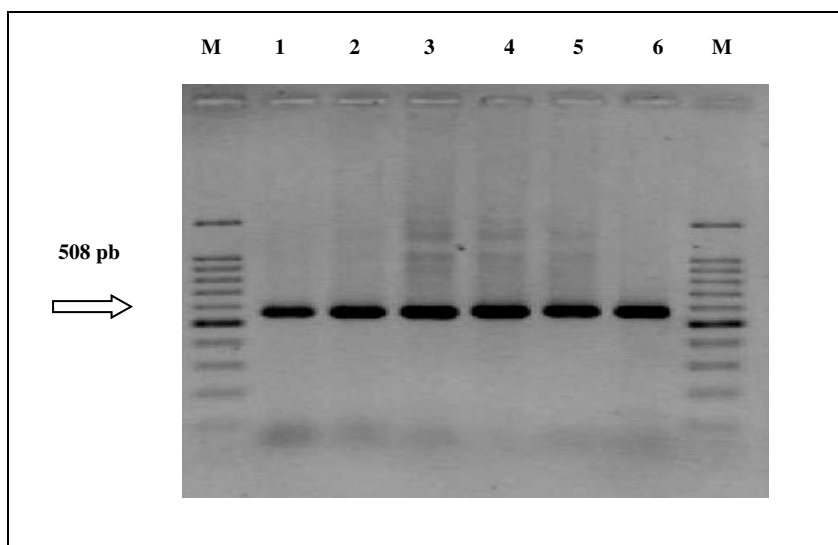


Figura 16. PCR en gradiente de *citocromo b* de aves a partir de muestras de sangre de pato. Línea 1, 45 °C; línea 2, 48 °C; línea 3, 50 °C; línea 4, 53° C; línea 5, 55 °C. Línea 6, 58 °C. M, marcador de 100 pb.

De acuerdo a ambos resultados se decidió considerar 53 °C como la temperatura de alineamiento óptima para el PCR de *citocromo b* de aves.

V.1.3.3 Purificación del producto de PCR

Adicionalmente se realizó la purificación de cada una de las 2 bandas del producto de PCR obtenido con el DNA de gallina a 53 °C. Previamente, se realizó una electroforesis en gel de agarosa 2% de casi todo el producto de PCR (Figura 17) obtenido para tener una mayor cantidad de muestra para purificar a partir del gel. Posteriormente se purifico el producto de PCR usando el kit purificación de Promega.

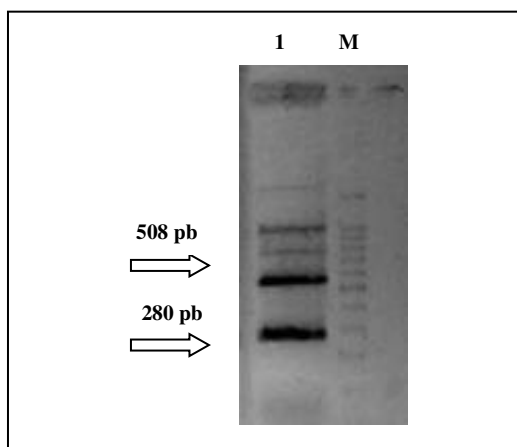


Figura 17. Electroforesis en gel de agarosa 2% para purificación de bandas a partir de gel. Línea 1, Producto de PCR. M, marcador de 100 pb.

Los productos de PCR eluidos de las bandas superior e inferior fueron cuantificados usando el espectrofotómetro y sometidos a electroforesis en un gel de agarosa 2%, evidenciándose ambas bandas purificadas (Figura 18).

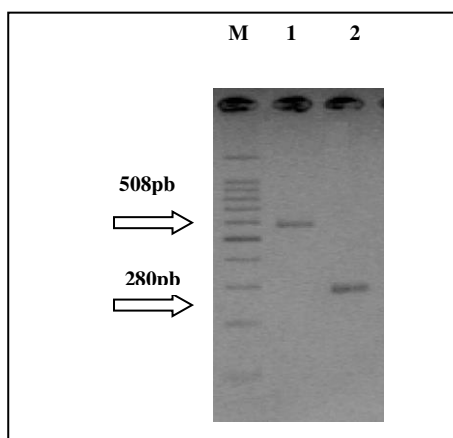


Figura 18. Electroforesis en gel de agarosa 2% de las bandas purificadas del gel. Línea 1, Banda superior; línea 2, banda inferior. M, marcador de 100 pb.

Se realizó una dilución 1/20 de los productos de PCR eluidos de cada banda y también del producto de PCR inicial purificado. Posteriormente, fueron sometidos a una reamplificación, para identificar posibles amplicones internos, usando los primers de aves disminuyendo el número de ciclos de PCR: 95 °C x 5'; 20 ciclos de 94 °C x 30'', 53 °C x 50'', 72 °C x 40''; y una elongación final de 72 °C x 7' (Figura 19).

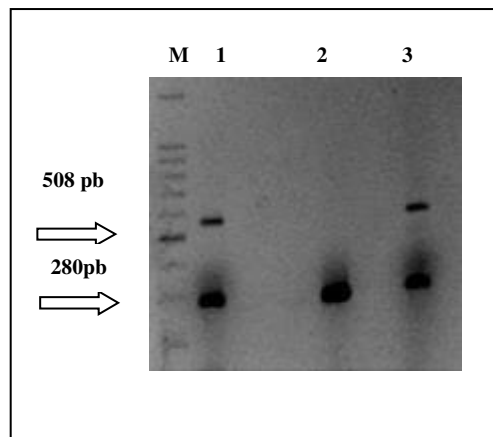


Figura 19. Reamplificación de los productos purificados de PCR de *citocromo b* de aves. Línea 1, reamplificado del producto de PCR inicial; línea 2, reamplificado de la banda inferior; línea 3, reamplificado de banda superior. M, marcador de 100 pb.

Los resultados mostraron que al reamplificar el amplicón de la banda superior purificada (línea 3), uno de los primers se ancla además en una región interna del producto de 508 pb (banda superior), generando una banda adicional de menor tamaño (banda inferior). En el caso de la reamplificación del producto purificado de la banda inferior solo se evidencia la banda del mismo tamaño. Posteriormente mediante el secuenciamiento de ambos amplicones se determinó que el primer reverse se anclaba en dicha región interna.

La purificación del gel en caso de obtener 2 bandas usando el set de primers de *citocromo b* de aves fue necesaria, seguido del secuenciamiento y análisis.

V.1.4 PCR de *citocromo b* de reptiles

De manera alternativa se utilizaron primers que amplifican una región del *citocromo b* de reptiles y que amplifican además secuencias de mamíferos y aves (Cupp et al., 2004). Se utilizó para la optimización del PCR, como control positivo 10 ng de DNA extraído a partir de sangre heparinizada de *Chelonoidis denticulata* “tortuga motelo”.

V.1.4.1 Gradiente de temperaturas de alineamiento

Los resultados del PCR en gradiente (46 °C- 63 °C) utilizando primers de *citocromo b* de reptiles, evidenciaron un amplicón intenso de alrededor de 280 pb, siendo 50 °C la temperatura óptima (Figura 20).

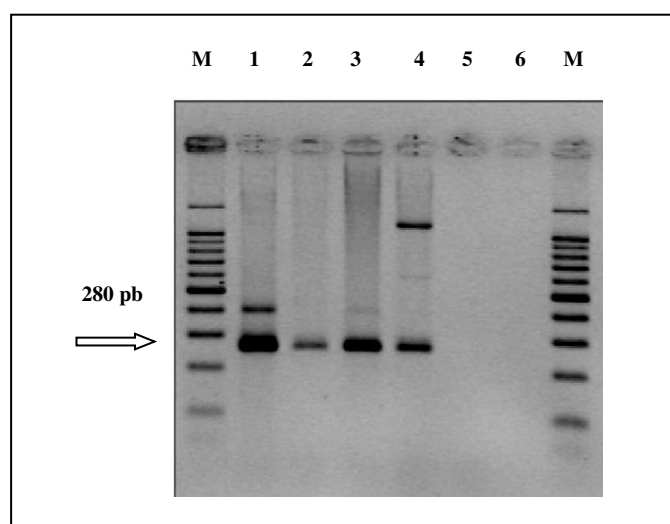


Figura 20. Gradiente de temperaturas de alineamiento PCR de *citocromo b* de reptiles. Línea 1, 46 °C; línea 2, 48 °C; línea 3, 50 °C; línea 4, 53 °C; línea 5, 56 °C; línea 6, 60 °C. M, marcador de 100 pb.

V.1.4.2 Gradiente de MgCl₂

Se evidenció amplificación a partir de 1 mM de MgCl₂, siendo más intensa a 2 mM de MgCl₂ (Figura 21).

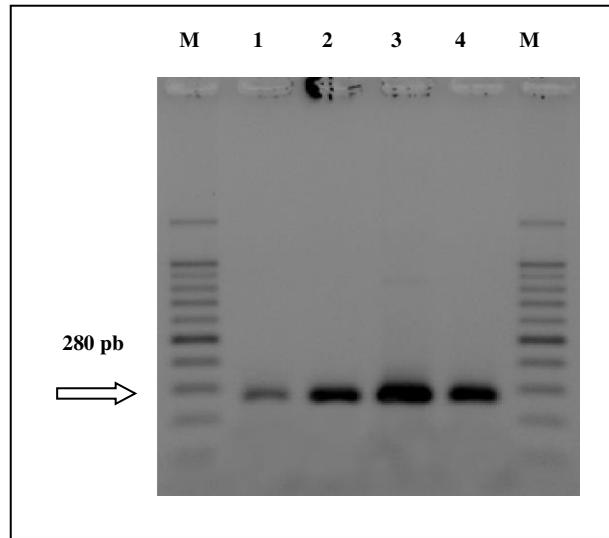


Figura 21. Gradiente de $MgCl_2$ para el PCR de *citocromo b* de reptiles. Línea 1, 1 mM $MgCl_2$; línea 2, 1,5 mM $MgCl_2$; línea 3, 2 mM $MgCl_2$; línea 4, 2,5 mM $MgCl_2$; M, marcador de 100 pb.

V.2 Sensibilidad del PCR de *citocromo b*

La cantidad mínima de DNA para obtener amplicones usando los sets de primers de *citocromo b* de aves, mamíferos y reptiles, a partir de los controles de DNA (pato, perro y tortuga motelo), fue de 10pg, 100pg y 100pg respectivamente (Figura 22).

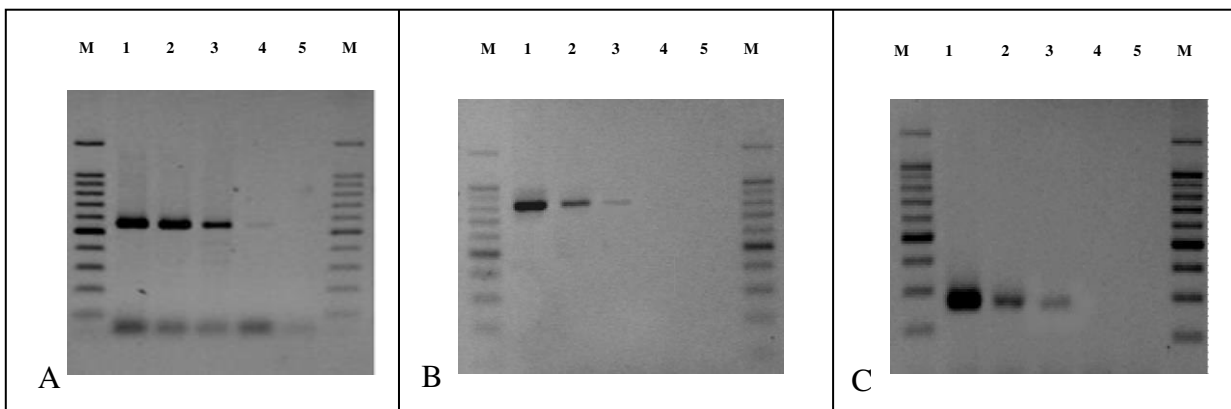


Figura 22. Sensibilidad del PCR de *citocromo b* de aves (A), mamíferos (B) y reptiles (C) a diferentes concentraciones de DNA. Línea 1, 10 ng; línea 2, 1 ng; línea 3, 100 pg; línea 4, 10 pg y línea 5, 1 pg. M, marcador de 100 pb.

V.3 Rendimiento del PCR de *citocromo b*

El DNA extraído de la sangre de diferentes mamíferos, como *Homo sapiens* “humano”, *Mus musculus* “ratón”, *Equus caballus* “caballo”, *Canis familiaris* “perro”, *Felis catus* “gato”, *Sus scrofa* “cerdo”; y aves, como : *Gallus gallus* “gallina”, *Cairina moschata* “pato”, *Aratinga mitrata* “loro”, *Amazona orocephala* “loro”, *Aratinga erythrogenys* “loro cabeza roja”, *Graydidasculus brachyurus* “tordo negro” y *Meleagris gallopavo* “pavo”, fueron sometidos a la reacción de PCR usando el set de primers de mamíferos y aves de *citocromo b* para validar el ensayo molecular (Figura 23).

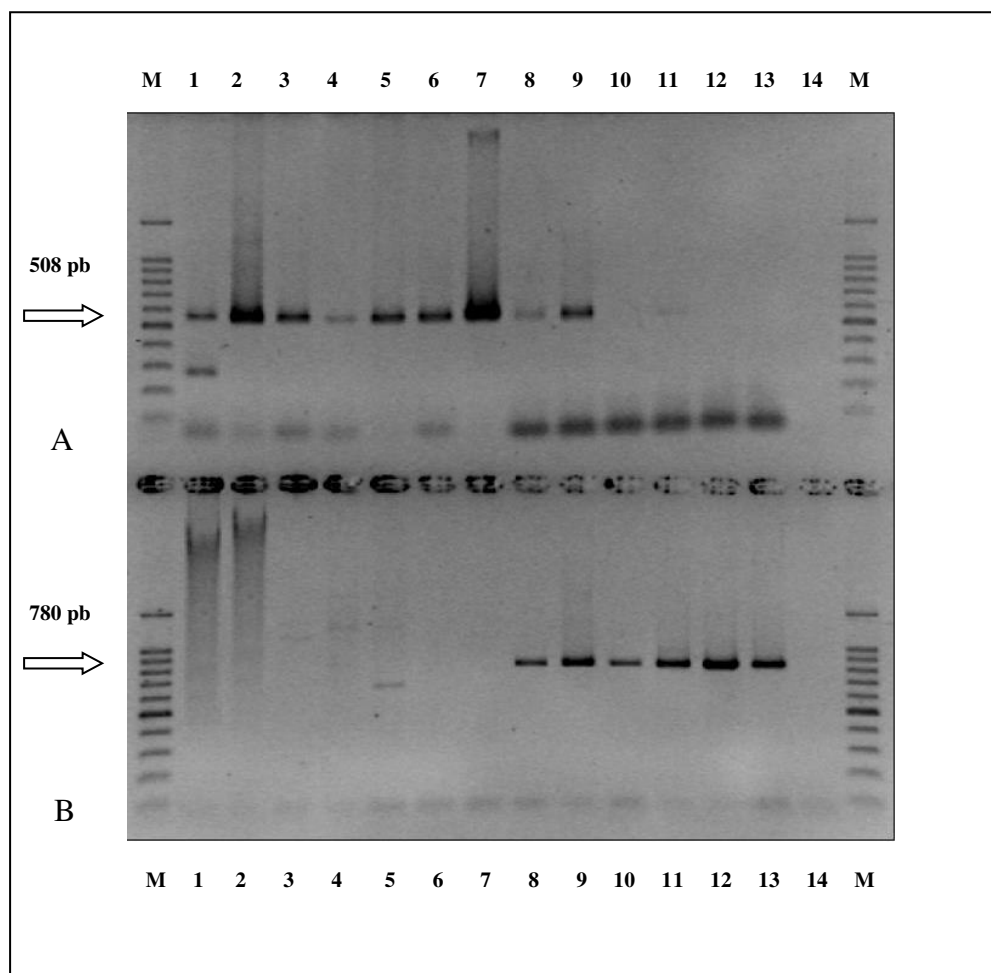


Figura 23. Análisis de PCR de las muestras de DNA de aves y mamíferos usando primers de *citocromo b* de aves (**A**) y primers de *citocromo b* de mamíferos (**B**). Línea 1-7, DNA de aves (gallina, pato, loro, tordo, pavo, loro, loro); línea 8-13, DNA de mamíferos (perro, caballo, humano, cerdo, ratón y gato); línea 14, negativo. M, marcador de 100 pb.

Por un lado, con los primers de *citocromo b* de aves se observó que todas las muestras de DNA provenientes de aves amplificaron un producto de 508 pb. En el caso de *Gallus gallus* “gallina” se evidenció una banda adicional de 280 pb (Figura 23A) como se mencionó anteriormente en los resultados. Además, se obtuvo amplificación con las muestras de DNA de *Canis lupus familiaris* “perro”, *Equus caballus* “caballo” y ligeramente en *Homo sapiens* “humano”.

Por otro lado, con los primers de mamíferos se obtuvo amplificación en las muestras provenientes de mamíferos de un único producto de PCR de 780 pb. Adicionalmente se evidenció amplificación de bandas tenues de diferente tamaño en algunas muestras de DNA proveniente de aves.

Posteriormente se realizó el secuenciamiento de los productos de PCR de *citocromo b* de *Homo sapiens* “humano”, *Mus musculus* “ratón”, *Equus caballus* “caballo”, *Canis familiaris* “perro”, *Felix catus* “gato”, *Sus scrofa* “cerdo”, *Gallus gallus* “gallina”, *Cairina moschata* “pato”, *Aratinga mitrata* “aratinga mitrada”, *Amazona ochrocephala* “loro real amazónico”, *Aratinga erythrogenys* “loro cabeza roja”, *Graydidascalus brachyurus* “tordo negro” y *Meleagris gallopavo* “pavo”, de acuerdo a la metodología mencionada en materiales y métodos, usando nuevamente los sets de primers (forward y reverse) de *citocromo b* de mamíferos y aves para el secuenciamiento de los amplicones en ambas direcciones. Las secuencias fueron obtenidas por consenso editadas con el programa Sequencher. Posteriormente fueron exportadas en formato de texto (Anexo 8), y comparadas con la base de datos del Genbank con el programa Blastn del NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) para identificar el espécimen en estudio. En el caso de los productos de PCR de *citocromo b* de gallina, se realizó el secuenciamiento al producto de PCR de las bandas superior e inferior, para conocer cuál de ellas sería informativa para el estudio. Los resultados del secuenciamiento confirmaron la identidad de las muestras en cuestión con una máxima identidad de 99-100% en el caso de humano, ratón, caballo, perro, cerdo, pato, gallina y pavo. En el caso de los animales silvestres como loro real amazónico, tordo negro, y loros del género *Amazonas*, el porcentaje de identidad fue de 98%, 99% y 95 % respectivamente (Tabla 12).

Tabla 12. Identificación de especies de vertebrados putativamente en el Genbank, a partir del secuenciamiento de productos de PCR de *citocromo b* de aves y mamíferos

| Muestra de DNA | Porcentaje de Identidad | Vertebrado identificado en el Genbank | | No. Accesoión |
|---|-------------------------|---------------------------------------|---|---------------|
| <i>Homo sapiens</i> "humano" | 100 | <i>Homo sapiens</i> |  | JQ411480.1 |
| <i>Mus musculus</i> "ratón" | 99 | <i>Mus musculus</i> |  | JX945979.1 |
| <i>Equus caballus</i> "caballo" | 100 | <i>Equus caballus</i> |  | JN398417 |
| <i>Canis familiaris</i> "perro" | 100 | <i>Canis familiaris</i> |  | JF342906 |
| <i>Felis catus</i> "gato" | 99 | <i>Felis catus</i> |  | AB194813.1 |
| <i>Sus scrofa</i> "cerdo" | 100 | <i>Sus scrofa</i> |  | KC250275.1 |
| <i>Gallus gallus</i> "gallina" | 99 | <i>Gallus gallus</i> |  | HQ857212.1 |
| <i>Cairina moschata</i> "pato" | 99 | <i>Cairina moschata</i> |  | EU755254.1 |
| <i>Aratinga mitrata</i> "loro" | 95 | <i>Aratinga leucophthalmus</i> |  | AF370767.1 |
| <i>Amazona ochrocephala</i> "loro real amazónico" | 98 | <i>Amazona ochrocephala</i> |  | AY283468.1 |
| <i>Aratinga erythrogenys</i> "loro cabeza roja" | 95 | <i>Aratinga leucophthalmus</i> |  | AF370767.1 |
| <i>Meleagris gallopavo</i> "pavo" | 100 | <i>Meleagris gallopavo</i> |  | JF275060.1 |
| <i>Graydidascalus brachyurus</i> "tordo negro" | 100 | <i>Graydidascalus brachyurus</i> |  | DQ143296.1 |

V.4 Identificación de especímenes

Se colectaron 22675 especímenes de mosquitos (Familia: *Culicidae*) entre culicinos y anofelinos durante los meses de enero-marzo del 2009 en las provincias Datem del Marañón y Alto Amazonas en el departamento de Loreto, usando trampas de luz, trampas de cebo humano y mochilas aspiradoras.

Cuatrocientos sesenta y seis mosquitos con evidencia de sangre en el abdomen fueron seleccionados e individualizados. De ellos, 345 mosquitos fueron identificados a nivel de género a través de claves dicotómicas. Estos pertenecen a 5 géneros, entre ellos tenemos: *Culex Culex* spp., 151 especímenes; *Mansonia titillans/ indubitans*, 13 especímenes; *Uranotaenia* spp., 3 especímenes; *Coquilletidia* spp., 13 especímenes y *Culex Melanoconiom* spp., 21 especímenes.

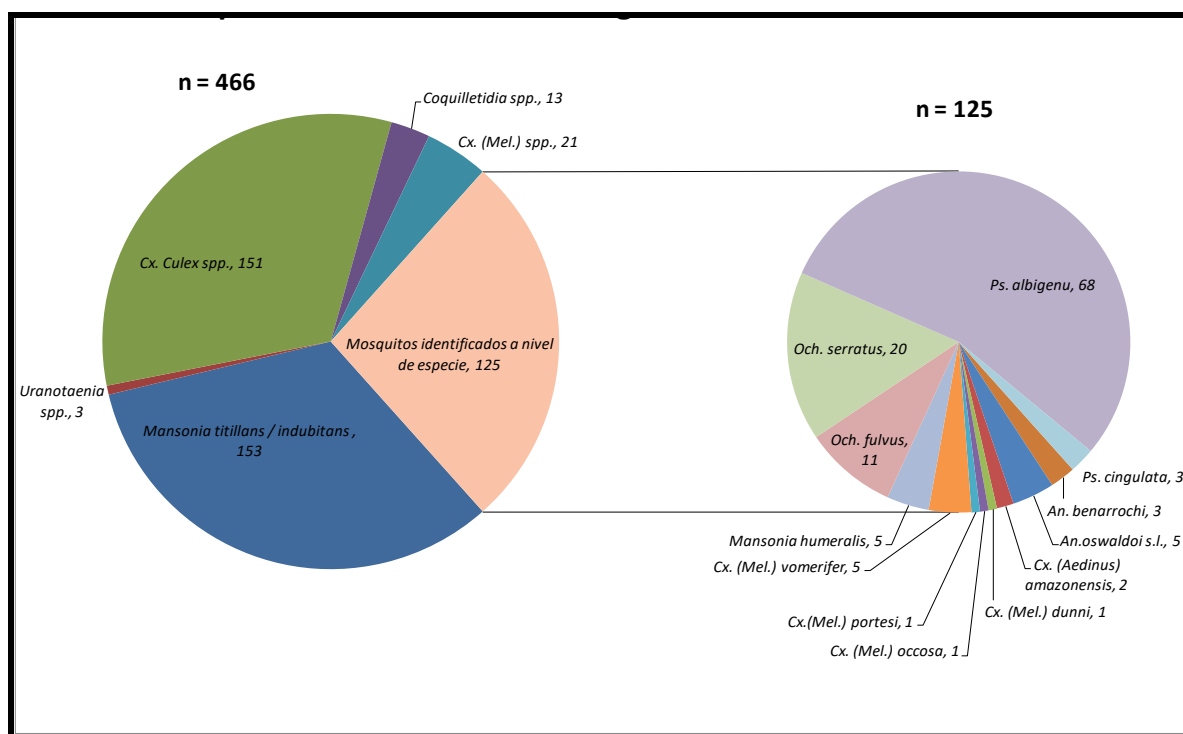


Figura 24. Mosquitos con evidencia de sangre en el abdomen colectados en las provincias de Datem el Marañón y Alto Amazonas entre enero-marzo del 2009

A nivel de especie se identificaron taxonómicamente 125 mosquitos con evidencia de sangre en el abdomen (Tabla 13), representando 12 especies diferentes: *Anopheles benarrochi*, 3 especímenes; *Anopheles oswaldoi* s.l., 5

especímenes; *Culex. (Aedinus) amazonensis*, 2 especímenes; *Culex (Melanoconiom) dunnii*, 1 espécimen; *Cx. (Mel.) occosa*, 1 espécimen; *Cx. (Mel.) portesi*, 1 espécimen; *Cx. (Mel.) vomerifer*, 5 especímenes; *Mansonia humeralis*, 5 especímenes; *Ochlerotatus. fulvus*, 11 especímenes, *Och. serratus*, 20 especímenes; *Psorophora albigena*, 68 especímenes; y *Ps. cingulata* 3 especímenes. Estos mosquitos fueron destinados para el desarrollo de la presente tesis.

La mayor cantidad de mosquitos alimentados identificados corresponden a *Ps. albigena*, *Och. fulvus* y *Och. serratus* (Figura 25) representando el 54%, 16% y 9 % respectivamente.



Figura 25. *Ochlerotatus serratus* (A) y *Ochlerotatus fulvus* (B)

Tabla 13. Mosquitos con evidencia de sangre identificados a nivel de especie (n = 125)

| Especies de mosquitos | No. | % Total |
|---------------------------------------|------------|----------------|
| <i>Anopheles. benarrochi</i> | 3 | 2 |
| <i>Anopheles. oswaldoi</i> s.l. | 5 | 4 |
| <i>Culex (Aedinus) amazonensis</i> | 2 | 2 |
| <i>Culex (Melanoconion) dunnii</i> | 1 | 1 |
| <i>Culex (Melanoconion) occosa</i> | 1 | 1 |
| <i>Culex (Melanoconion) portesi</i> | 1 | 1 |
| <i>Culex (Melanoconion) vomerifer</i> | 5 | 4 |
| <i>Mansonia humeralis</i> | 5 | 4 |
| <i>Ochlerotatus fulvus</i> | 11 | 9 |
| <i>Ochlerotatus serratus</i> | 20 | 16 |
| <i>Psorophora albigena</i> | 68 | 54 |
| <i>Psorophora cingulata</i> | 3 | 2 |

Los 125 especímenes fueron disectados de manera estéril, separándose el abdomen y cefalotórax individualmente, transferidos individualmente a criotubos marcados y llevados a -70 °C para la identificación de las fuentes de alimentación y realizar el cultivo celular para la evaluación de presencia de virus correspondiente.

V.5 Identificación de fuentes de alimentación

V.5.1 Extracción y cuantificación de DNA

Los abdómenes de los mosquitos con sangre (n =125) fueron sometidos a extracción de DNA y cuantificados mediante el espectrofotómetro Nanodrop. La cantidad de DNA extraído de los mosquitos obtenido varió de acuerdo con el tamaño de cada espécimen, así como de la cantidad de sangre presente en el abdomen (Figura 26).

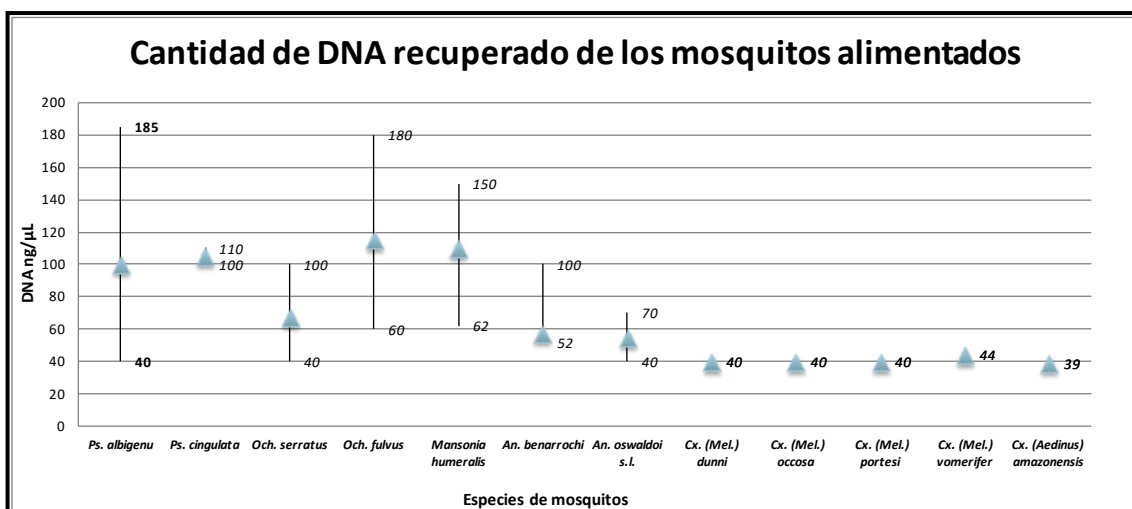


Figura 26: Rango de cantidad de DNA obtenido (ng/μL) de los mosquitos con evidencia de sangre en el abdomen colectados en las provincias de Datem el Maraón y Alto Amazonas entre enero-marzo del 2009.

La mayor cantidad de DNA se obtuvo de las especies de mosquitos *Och. fulvus* y *Ps. albigena*, seguidas de *Ps. cingulata*, *Mansonia humeralis* y *Och serratus*; mientras que las menores cantidades fueron de las especies de

Anopheles spp. y de las especies de *Cx. (Melanoconion)* spp., donde se obtuvieron en promedio 55 ng/ μ L y 40 ng/ μ L de DNA respectivamente.

V.5.2 PCR de *citocromo b*

El DNA extraído de cada abdomen del mosquito fue sometido a la reacción de PCR de *citocromo b* con los 2 set de primers de aves y mamíferos. Para ello se consideró entre 100-150 ng de DNA para cada reacción de PCR.

Los resultados del PCR se evidencian en las Figuras 27-29:

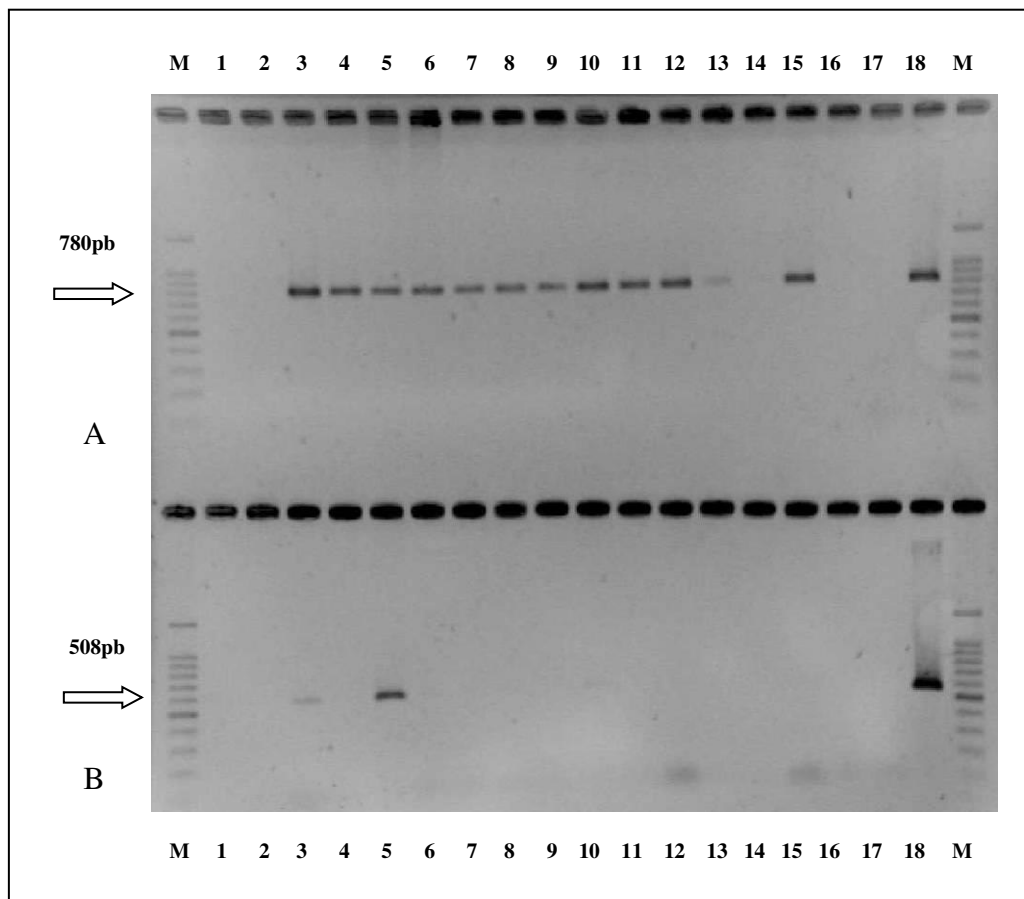


Figura 27: Análisis del PCR para la identificación de fuentes de alimentación de mosquitos, usando primers de *citocromo b* de mamíferos (A) y primers de *citocromo b* de aves (B). Línea 1-9, *Ps. albigena*; línea 10-13, *Och serratus*; línea 14-16, *Cx. (Mel.) vomerifer*; línea 17, control negativo; línea 18, control positivo. M, marcador de 100 pb.

En la Figura 27, en el carril 3 y 5 que corresponde a DNA extraído a partir de *Ps. albigena* se observó amplificación con los 2 set de primers. Mientras que

las demás muestras (a excepción del carril 1 y 2) amplificaron solamente con el set de primers de mamíferos.

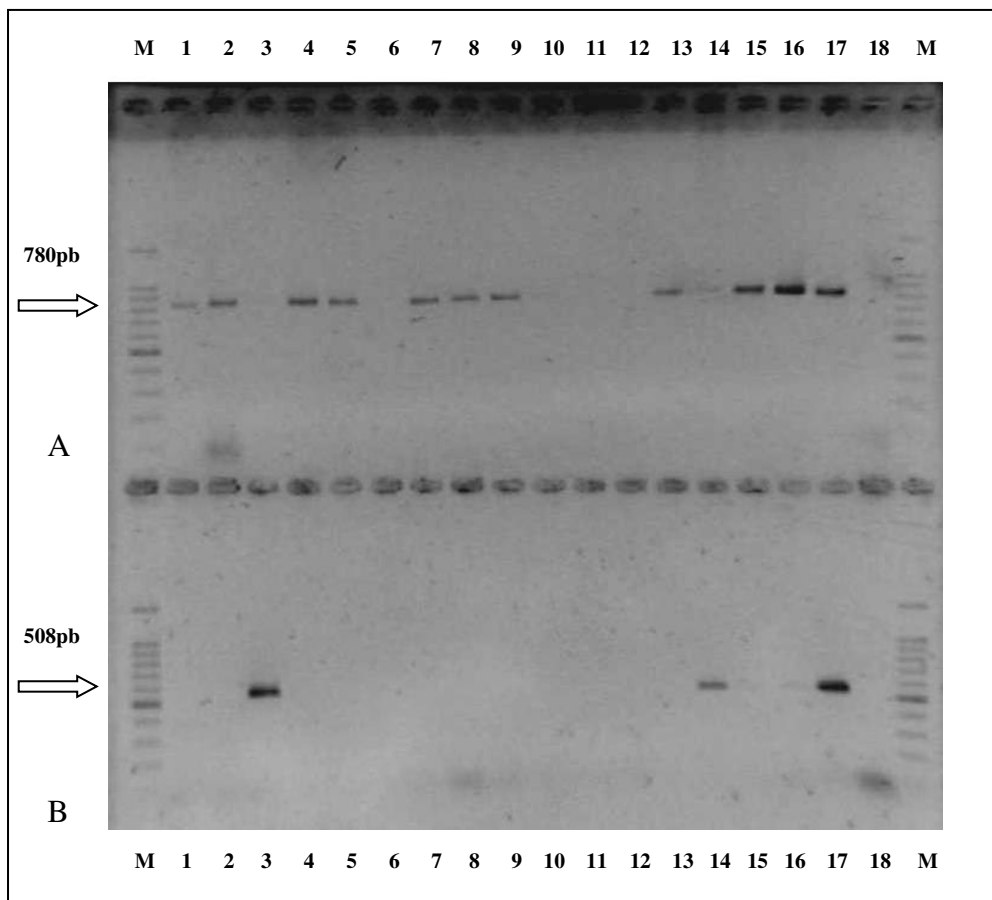


Figura 28: Análisis del PCR para la identificación de fuentes de alimentación de mosquitos, usando primers de *citocromo b* de mamíferos (A) y primers de *citocromo b* de aves (B). Línea 1-2, *Ps. cingulata*; línea 3-13, *Och. serratus*; línea 14, *Cx. (Mel.) dunnii*; línea 15, *Cx. (Mel.) occosa*; línea 16, *Cx. (Mel.) vomerifer*; línea 17, control positivo; línea 18, control negativo. M, marcador de 100 pb.

En la Figura 28, en el carril 3 se evidencia una muestra de *Och. serratus* que solamente amplifica con los primers de aves. En el carril 6, 10, 11 y 12 no se observa amplificación con ninguno de los primers.

En la Figura 29, en el carril 16 se observó una muestra proveniente de *Ps. albigena* que amplificó solamente con los primers de aves, y las demás muestras amplificaron con los primers de mamíferos.

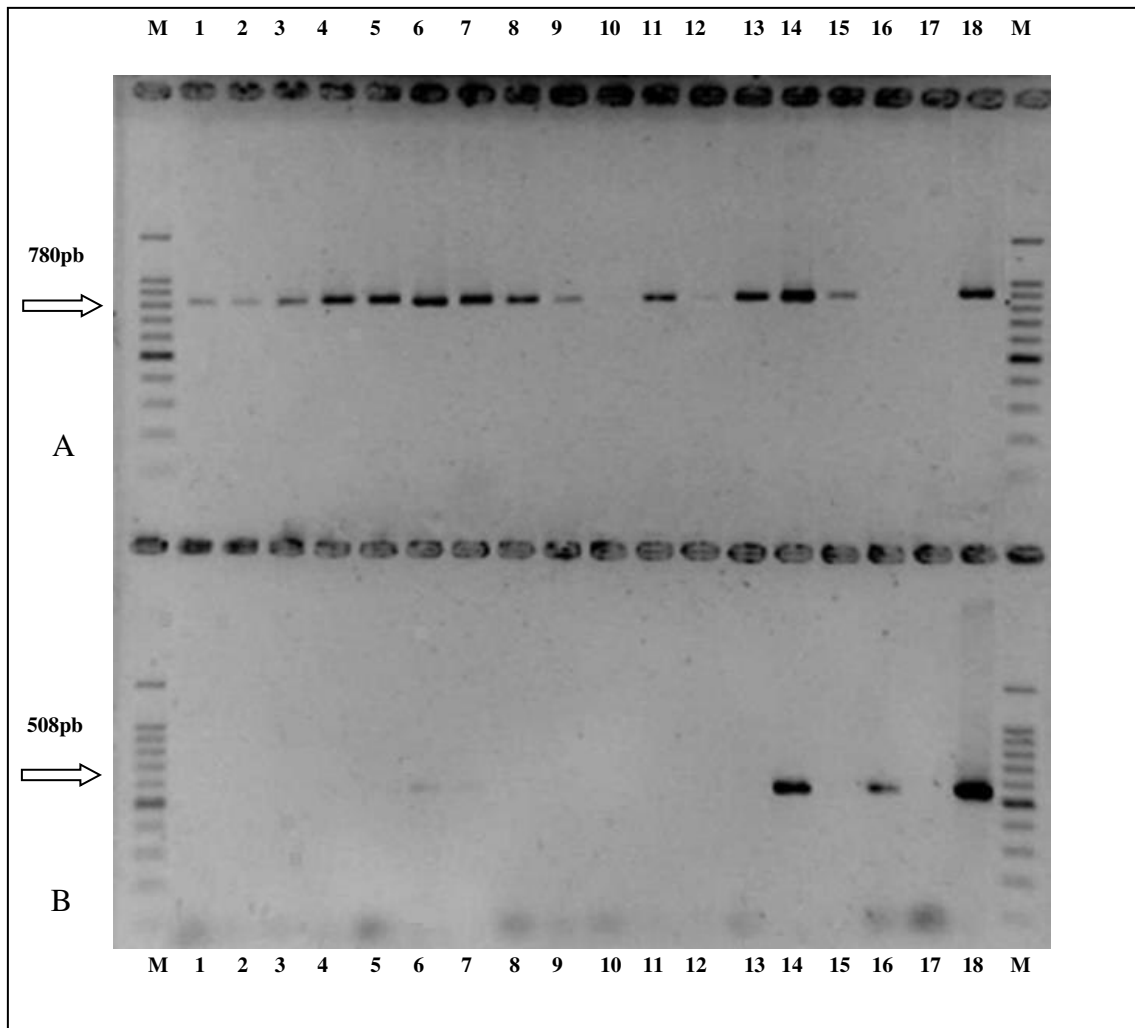


Figura 29: Análisis del PCR para la identificación de fuentes de alimentación de mosquitos, usando primers de *citocromo b* de mamíferos (**A**) y primers de *citocromo b* de aves (**B**). Línea 1-3, *An. benarrochi*; línea 4-6, *Och serratus*; línea 7-10, *M. humeralis*; línea 11-16, *Ps. albigena*; línea 17, control negativo; línea 18, control positivo. M, marcador de 100 pb.

En la mayoría de las muestras de DNA se evidenció amplificación usando sólo primers de *citocromo b* de mamíferos ($n = 95$), en otras muestras se evidenció amplificación usando los primers de *citocromo b* de aves ($n = 3$) y en otras se evidenció amplificación usando ambos primers de PCR de aves y mamíferos ($n = 13$).

De las 125 muestras de DNA, se evidenciaron productos de PCR usando los primers de aves y/o mamíferos en 111 muestras (88,8%).

Aquellas muestras que no dieron amplificación con ninguno de los 2 sets de primers (n = 14, 11,2%), fueron evaluadas con el otro set de primers de *citocromo b* de reptiles.

Los resultados evidenciaron amplificación en 4 muestras de este grupo, donde 3 especímenes correspondían a *Och. serratus* y 1 espécimen a *Ps. albigenu*. (Figura 30)

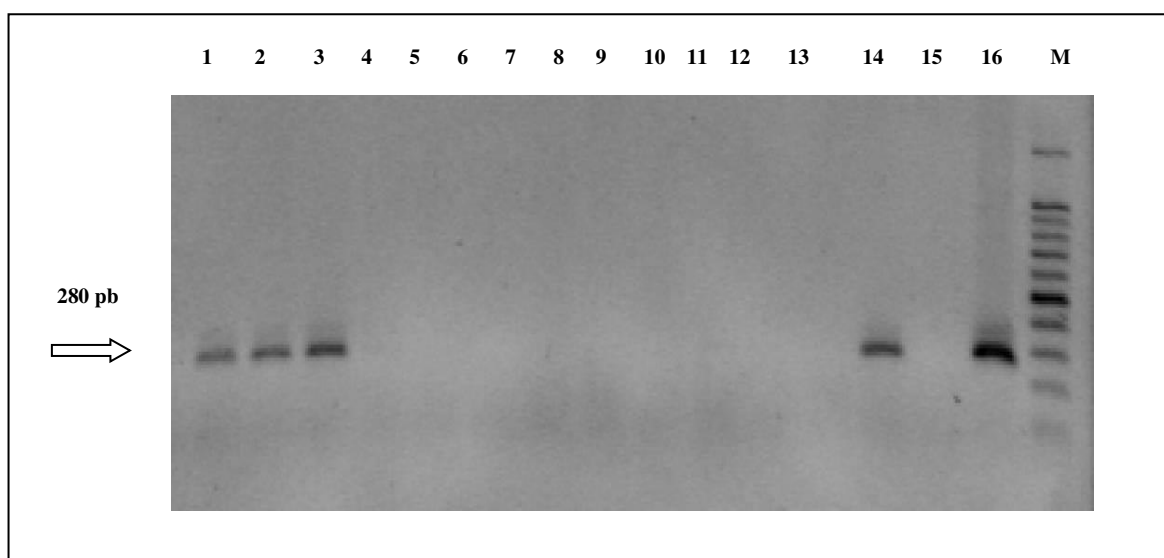


Figura 30: Análisis del PCR para la identificación de fuentes de alimentación de mosquitos usando primers de *citocromo b* de reptiles. Línea 1-4, *Och. serratus*; línea 5-7, *Cx. (Mel.) vomerifer*; línea 8-10, *Och.fulvus*; línea 11, *Mansonia humeralis*; línea 12, *Cx. (Aedinus) amazonensis*; línea 13-14, *Ps. albigenu*; línea 15, control negativo; línea 16, control positivo. M, marcador de 100 pb.

El total de muestras que amplificaron con los primers de *citocromo b* de vertebrados (positivos) en general fue de 115 (92%) distribuidas en: mamíferos, 95 (76%); aves, 3 (2%); mamíferos y aves 13 (11%); reptiles, 4 (3%). Mientras que el total de muestras que no amplificaron (negativos) fue de 10 (8%) (Figura 31).

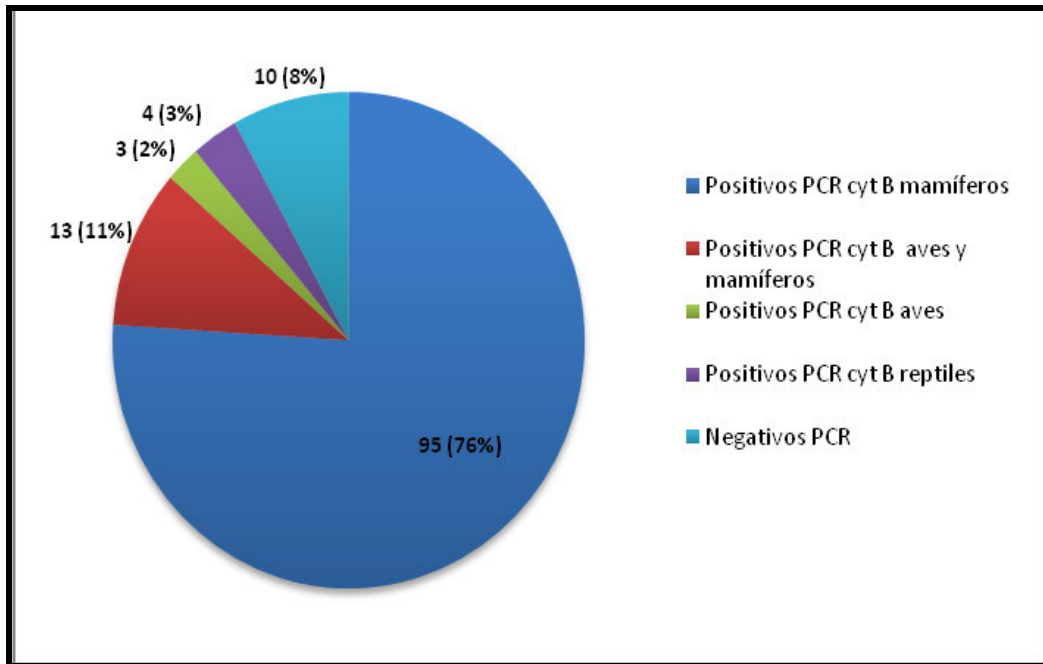


Figura 31. Distribución del número de amplicones de PCR para cada set de primers de *citocromo b* (porcentaje).

Se obtuvieron 128 amplicones de *citocromo b*, de las 115 muestras positivas, debido a que 13 muestras amplificaron con los 2 set de primers.

V.5.3 Secuenciamiento

Cada uno de los 128 amplicones obtenidos, fueron sometidos a la reacción de secuenciamiento Big Dye Terminator de acuerdo con el procedimiento mencionado en materiales y métodos. Las secuencias fueron analizadas en ambos sentidos con la secuencia de los 2 primers (forward y reverse) para generar una secuencia consenso (del inglés “contig”), usando el software Sequencher (Figura 32).

Se evaluó la calidad de la señal, discriminación y caracterización de bases del cromatograma e identidad, considerando además una secuencia de referencia por cada amplicón secuenciado.



Figura 32. Cromatograma de una secuencia de *citocromo b* de la sangre del hospedero presente en un mosquito *Ps. albigena*.

Posteriormente las secuencias consenso fueron sometidas al análisis en el Genbank por BLASTn para confirmar la identidad de las fuentes de alimentación de los mosquitos (Figura 33).

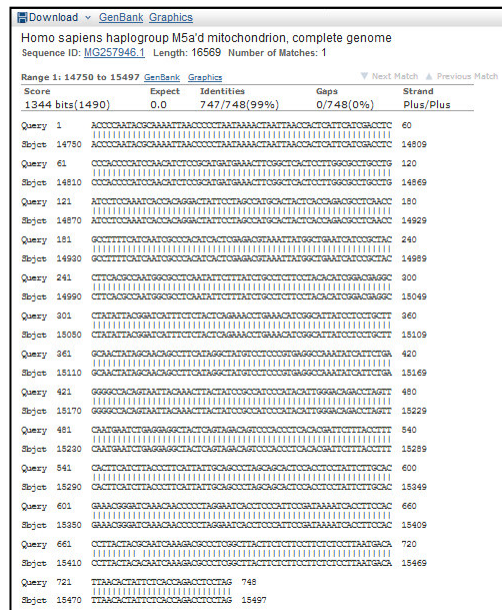


Figura 33: Identificación de fuente de alimentación (*Homo sapiens*) de un mosquito por identidad nucleotídica en el Genbank.

Durante el análisis de las secuencias de 2 amplicones, se evidenció superposición de 2 secuencias en el cromatograma, lo que indicaba una posible doble fuente de alimentación, dificultando la caracterización de las secuencias consenso y el análisis en el Genbank.

En el secuenciamiento del primer amplicón proveniente de *Ps. albigena* (Mx 353) usando los primers de *citocromo b* de mamíferos, se detectó que una de las secuencias provenía de un perro (Figura 34A). Al secuenciar el otro amplicón proveniente de *Cx. (Mel.) dunnii* (Mx 439) usando los primers de *citocromo b* de aves, se detectó que una de las secuencias provenía de un oso perezoso (Figura 34B).

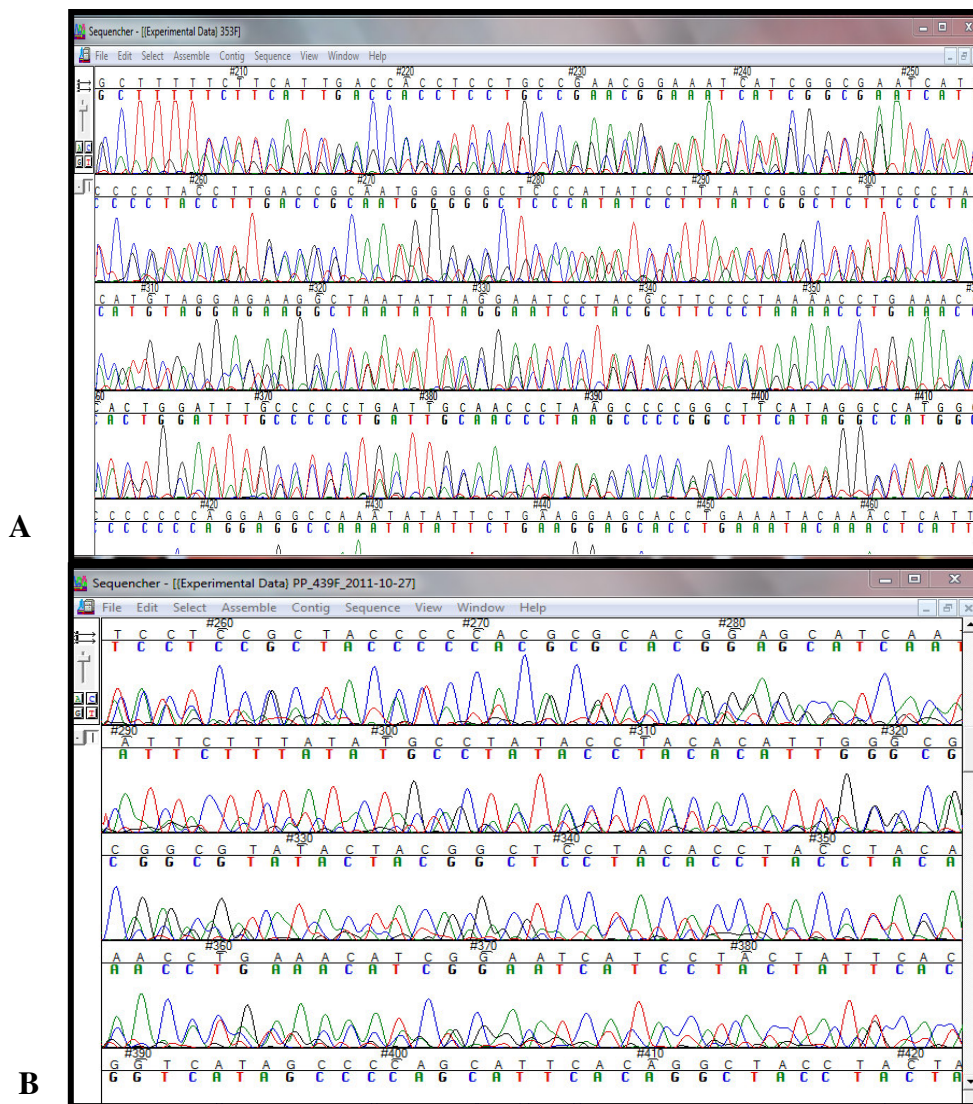


Figura 34: Doble fuente de alimentación detectada en mosquitos. En *Psorophora albigena* (A) y en *Culex Melanoconion dunnii* (B).

Adicionalmente para reconfirmar la identidad de la secuencia encontrada inicialmente, se amplificaron ambas muestras de DNA con los otros primers de *citocromo b* de reptiles y fueron secuenciados posteriormente.

Al analizar las secuencias se evidenció que correspondían a otra fuente de alimentación distinta a la encontrada inicialmente la cual correspondía a una fuente humana, evidenciándose así doble fuente de alimentación en los 2 mosquitos mencionados (*Ps. albigena* y *Cx. (Mel.) durni*).

Finalmente se obtuvieron 130 amplicones en total, de los cuales algunos amplificaron con 2 set de primers: aves-mamíferos (13), aves-reptil (1) y mamíferos-reptil (1) (Figura 35).

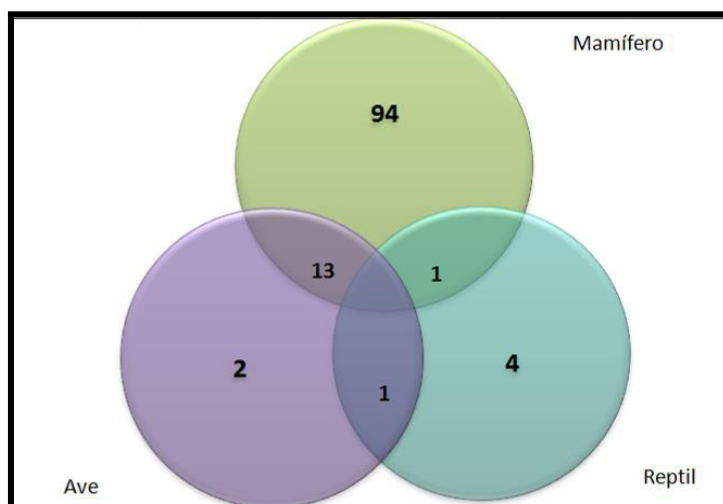


Figura 35: Distribución de los amplicones de *citocromo b* (n = 130) obtenidos y secuenciados a partir de los mosquitos colectados en el Departamento de Loreto (2009).

Durante el análisis de las secuencias fue necesario realizar búsquedas de bases de datos de *citocromo b*. En especial, de las posibles secuencias provenientes de animales silvestres.

En tal sentido, al analizar las secuencias provenientes de los hospederos en los mosquitos de código: 3 (*Ps. albigena*), 5 (*Cx. (Aedinus) amazonensis*), 436 y 641 (*Cx. (Mel). vomerifer*) se detectaron secuencias de ratas espinosas

(*Proechimys* spp.), con un porcentaje de identidad entre 88-90 % encontrada en el Genbank. Frente a ello, se realizó un análisis filogenético con secuencias de bases de de ratas espinosas de Perú y Sudamérica, provenientes del Museo de Zoología de Vertebrados de la Universidad de California, Berkeley.

Se realizó el alineamiento de las secuencias usando el programa ClustalX 2.0.11 (Larkin, 2007) con la base de datos, evaluándose la identidad nucleotídica.). El árbol filogenético de máxima probabilidad se muestra en la figura 36. Los resultados mostraron que uno de los 2 mosquitos *Cx. (Mel) vomerifer* se había alimentado de *Proechimys quadriplicatus*, y el otro *Cx. (Mel.) vomerifer* lo hizo de *Proechimys cuvieri*. Mientras que los mosquitos *Cx. (Aedinus) amazonensis* y *Ps. albigena* se habían alimentado de *Proechimys brevicauda* (Figura 36).

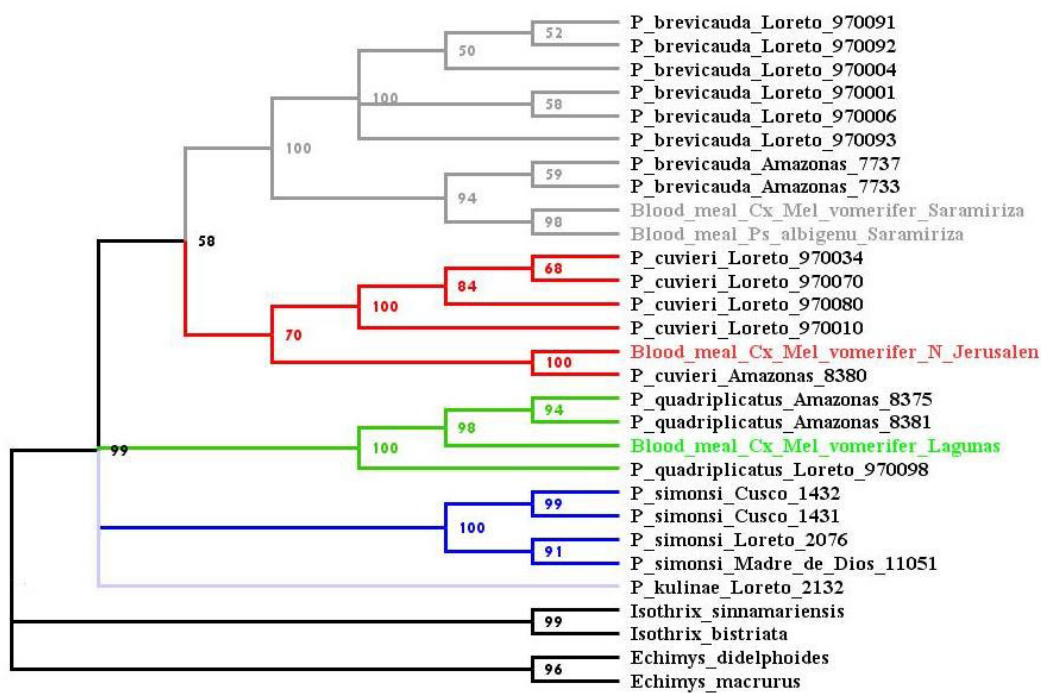


Figura 36: Cladograma de máxima parsimonia para los primeros 690 pb del gen de *citocromo b* para las ratas espinosas *Proechimys* en el Perú. Letras de colores representan las secuencias de *citocromo b* de *Proechimys* encontradas en los mosquitos en las diferentes localidades. Cada color de nodo corresponde a una especie de *Proechimys* en el Perú. Números en los nodos son valores de bootstrap (100 replicas) por encima de 50%. Secuencias de *Echymis* e *Isothrix* fueron los grupos externos.

Las secuencias de las fuentes de alimentación en resumen encontradas en los mosquitos se muestran en la Figura 37:

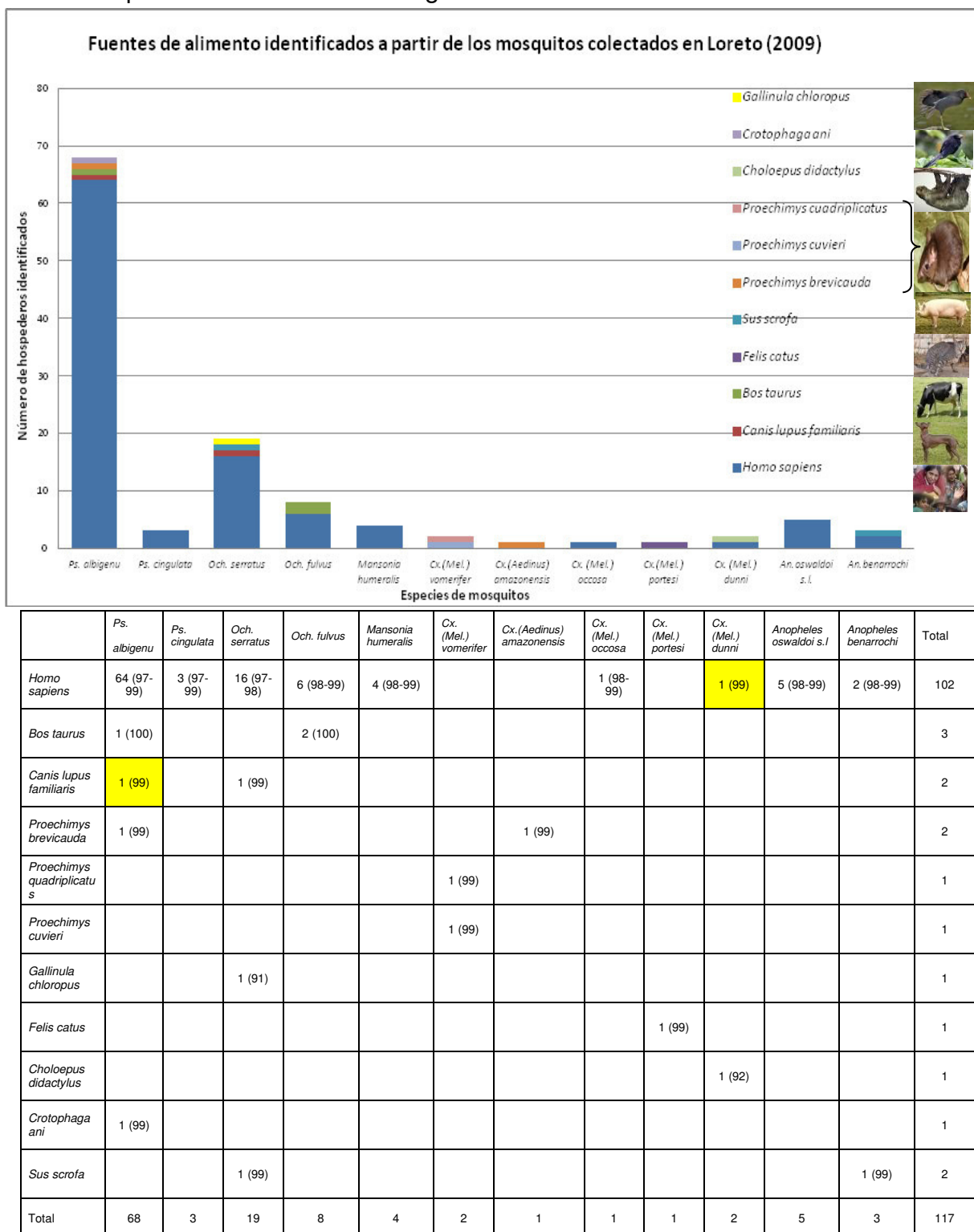


Figura 37: Composición de las fuentes de alimentación derivados de mosquitos colectados en el Departamento de Loreto. Número de hospederos identificados (% de identidad nucleotídica en la base de datos Genbank). Celda amarilla, representa doble fuente de alimentación.

En *Ps. albigenu* (n = 67), 5 fuentes de alimentación fueron identificados. El más frecuente fue “humano” *Homo sapiens* (n = 63; 94 %), seguido por “vaca” *Bos taurus* (n = 1; 1,5%), “rata espinosa” *Proechimys brevicauda* (n = 1; 1,5 %) y un ave “garrapatera de pico liso” *Crotophaga ani* (n=1; 1,5 %). En un mosquito fue identificado fuentes de sangre mixta de humano y “perro” *Canis lupus familiaris* (n = 1; 1,5 %).

En *Och. serratus* (n = 19), 3 fuentes de alimentación fueron identificados. El más frecuente fue humano (n = 16), seguido por “perro” *Canis lupus familiaris* (n = 1), un “cerdo” *Sus scrofa* (n = 1) y una “polla de agua” *Gallinula chloropus* (n = 1) (91 % de identidad nucleotídica). En *Och. fulvus* (n = 8), 2 fuentes de alimentación fueron identificados “humano” *Homo sapiens* (n = 6) y “vaca” *Bos taurus* (n = 2).

En *Cx. (Mel.) vomerifer* (n = 2) y *Cx. (Aedinus) amazonensis* (n = 1), solamente se encontró sangre proveniente de “ratas espinosas” *Proechimys quadriplicatus*, *P. cuvieri* y *P. brevicauda*.

En *Cx. (Mel.) portesi* (n = 1), sólo una fuente de sangre de “gato” *Felis catus* fue obtenida. En *Cx. (Mel.) durni* (n = 1), una fuente de sangre mixta de “humano” *Homo sapiens* y “oso perezoso” *Choloepus didactylus* (92% de identidad nucleotídica) fueron identificados.

En *An. benarrochi* (n = 3), 2 diferentes fuentes de alimentación fueron identificados: “perro” *Canis familiaris* (n = 2) y “cerdo” *Sus scrofa* (n = 1). En *Mansonia humeralis* (n = 4), *Ps. cingulata* (n = 3), *An. oswaldoi* s.l. (n = 5), y *Cx. (Mel.) occosa* (n = 1) sólo fuente de sangre de “humano” *Homo sapiens* fueron obtenidas.

V.5.4 Fuentes de alimentación encontradas de acuerdo al tipo de Trampa

Los mosquitos que fueron colectados usando trampas de cebo humano (n = 91) en las zonas peridomiciliarias, se alimentaron mayormente de humanos (96,7%); y de menor número de cerdos y vacas (3,3%) (Tabla 14).

Tabla 14. Distribución de las fuentes de alimentación encontradas en los mosquitos colectados en Loreto (2009) usando diferentes tipos de trampas.

| Mosquitos | No. | % | Tipo de trampa | | |
|---|------------|------|----------------|----------------------|-------------|
| | | | Trampa de luz | Mochilas aspiradoras | Cebo humano |
| <i>Ps. albigena</i> | | | | | |
| Humano, <i>Homo sapiens</i> | 64 | 94,4 | 4 | 2 | 58 |
| Rata espinosa, <i>P. breviceauda</i> | 1 | 1,4 | 1 | | |
| Vaca, <i>Bos taurus</i> | 1 | 1,4 | | | 1 |
| Perro, <i>Canis lupus familiaris</i> | 1 | 1,4 | | 1 | |
| Ave garrapatera, <i>Crotophaga ani</i> | 1 | 1,4 | 1 | | |
| <i>Ps. cingulata</i> | | | | | |
| Humano, <i>Homo sapiens</i> | 3 | 100 | | 1 | 2 |
| <i>Och. fulvus</i> | | | | | |
| Humano, <i>Homo sapiens</i> | 6 | 75 | 1 | | 5 |
| Vaca, <i>Bos taurus</i> | 2 | 25 | 2 | | |
| <i>Och. serratus</i> | | | | | |
| Humano, <i>Homo sapiens</i> | 16 | 84,1 | | 2 | 14 |
| Perro, <i>Canis lupus familiaris</i> | 1 | 5,3 | 1 | | |
| Cerdo, <i>Sus scrofa</i> | 1 | 5,3 | | | 1 |
| Polla de agua, <i>Gallinula chloropus</i> | 1 | 5,3 | 1 | | |
| <i>Cx (Mel.) vomerifer</i> | | | | | |
| Rata espinosa, <i>P. cuvieri</i> | 1 | 50 | 1 | | |
| Rata espinosa, <i>P. quadriplicatus</i> | 1 | 50 | 1 | | |
| <i>Cx. (Aedinus) amazonensis</i> | | | | | |
| Rata espinosa, <i>P. breviceauda</i> | 1 | 100 | 1 | | |
| <i>Cx.(Mel.) occosa</i> | | | | | |
| Humano, <i>Homo sapiens</i> | 1 | 100 | | 1 | |
| <i>Cx. (Mel.) portesi</i> | | | | | |
| Gato, <i>Felis catus</i> | 1 | 100 | | 1 | |
| <i>Cx. (Mel.) dunni</i> | | | | | |
| Perezoso, <i>Choloepus didactylus</i> | 1 | 100 | 1 | | |
| Humano, <i>Homo sapiens</i> | 1 | 100 | 1 | | |
| <i>Mansonia humeralis</i> | | | | | |
| Humano, <i>Homo sapiens</i> | 4 | 100 | | | 4 |
| <i>An. oswaldoi</i> | | | | | |
| Humano, <i>Homo sapiens</i> | 5 | 100 | | | 5 |
| <i>An. benarrochi s.l.</i> | | | | | |
| Humano, <i>Homo sapiens</i> | 2 | 66,7 | 2 | | |
| Cerdo, <i>Sus scrofa</i> | 1 | 33,3 | | | 1 |
| TOTAL | 117 | | 18 | 8 | 91 |

Los mosquitos colectados usando mochilas aspiradoras dentro del domicilio (n = 8), se alimentaron de humanos (n = 6), y de mamíferos peridomésticos como perro y gato (n = 2). Usando esta técnica de colecta se encontró fuente doble de alimentación en un mosquito *Ps. albigenu*, que se alimentó de un humano y un perro dentro de un solo domicilio en la localidad de Saramiriza.

Los mosquitos colectados usando trampas de luz en el bosque (n = 18), tuvieron una mayor variedad de hospederos como alimentación: humanos (n = 8), ratas espinosas (n = 4), vaca (n = 2), ave garrapatera, polla de agua, perro y oso perezoso. Aquí se encontró fuente doble de alimentación en una especie de *Cx. (Mel.) dunnii*, el cual se alimentó de un oso perezoso y de un humano en la localidad de Lagunas.

V.6 Aislamiento viral

Durante los 12-14 días post-infección (dpi), no se evidenció efecto citopático en alguna de las 2 líneas celulares (C6/36 y Vero 76) durante la primera inoculación o primer pasaje (p1) de los 37 pools de mosquitos.

Para incrementar la probabilidad de aislar algún arbovirus se realizaron 2 pasajes adicionales (pasaje 2 y pasaje 3) posteriores a la primera inoculación (p1) de los 37 pools. No se evidenció un marcado efecto citopático en tales pasajes en los pools 1-27 (Figura 38, Muestra pool 23p3), sin embargo, se evidenció en el día 9-12 post-infección en el pasaje 3 un leve efecto citopático sobre las células Vero 76 en 8 grupos (28-37) (Figura 38, Muestra pool 30p3).

| | | Día 0 | Día 4 | Día 8 | Día 12 |
|----------------|----------------------|-------|-------|-------|--------|
| C6/36 | Control Negativo (-) | | | | |
| | Control Positivo (+) | | | | |
| | Muestra pool 23p3 | | | | |
| | Muestra pool 30p3 | | | | |
| VERO 76 | Control Negativo (-) | | | | |
| | Control Positivo (+) | | | | |
| | Muestra pool 23p3 | | | | |
| | Muestra pool 30p3 | | | | |

Figura 38: Cultivo de células (C6/36 y Vero 76) inoculado con pool de mosquito 23 y 30, y su efecto citopático (ECP) durante 12 días postinfección (0, 4, 8 y 12) luego de realizar 3 pasajes consecutivos. El control (+) fue inoculado con virus del Dengue-4, y el control (-) no fue inoculado.

V.7 Inmunofluorescencia indirecta

La cosecha de los cultivos celulares obtenidos de Vero 76 y C6/36 de cada uno de los 3 pasajes (p1-p3) de los 37 pools de mosquito, fueron sometidos a Inmunofluorescencia indirecta para la detección de antígeno de arbovirus dentro de las células.

La evaluación de las láminas de Inmunofluorescencia indirecta fue de acuerdo a la disposición de los anticuerpos para cada grupo de virus, como se mencionó en materiales y métodos.

En las muestras evaluadas (37 pools) no se detectó antígeno viral de los grupos de arbovirus (Flavivirus, Alphavirus, Bunyavirus y Cardiovirus) en alguna de las cosechas de los 2 cultivos celulares (C6/36 y Vero 76) obtenidos desde el pasaje inicial (p1) hasta el pasaje 3 (p3).

De manera representativa en la figura 39, se muestran el control positivo (Virus del Dengue serotipo 4), control negativo (células no infectadas) y una de las muestras de mosquito (pool 23p3) evaluadas, donde no se detectó antígeno viral para Flavivirus en las células inoculadas.

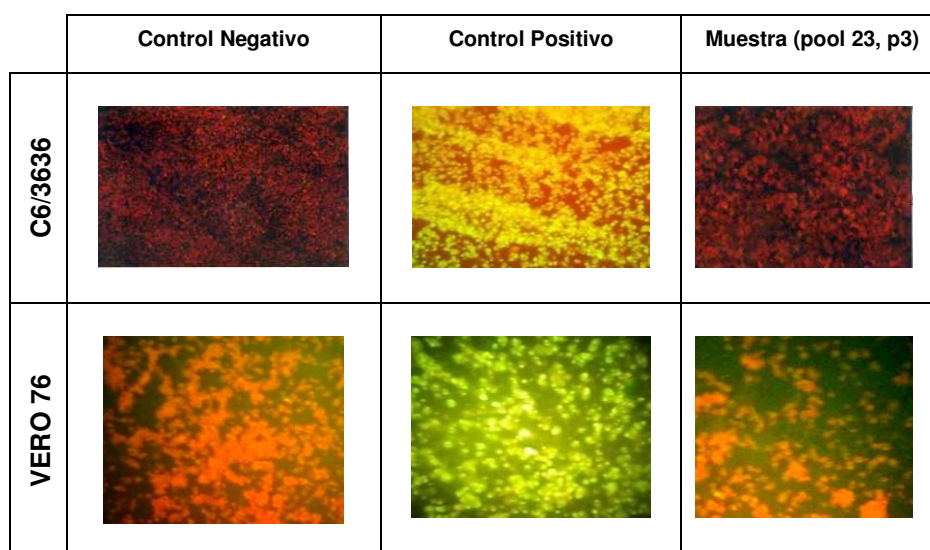


Figura 39: Inmunofluorescencia indirecta para detección de antígeno de Flavivirus en el cultivo celular (C6/36/36 y Vero 76) de un pool de mosquito pasaje3 (pool 23 p3). Se consideró el control positivo (células infectadas con virus del Dengue 4) y el control negativo (células no infectadas).

V.8 Reacción en cadena de polimerasa de arbovirus

Las 10 muestras que resultaron con un ligero efecto citopático en células Vero 76 (pool 28- pool 37) en el pasaje 3, y que resultaron negativas por Inmunofluorescencia indirecta de arbovirus, fueron sometidas a extracción de RNA y posteriormente a la reacción de PCR de Flavivirus y Alfavirus para detectar ácidos nucleicos usando primers genéricos de dichos grupos virales, tal como se mencionó en materiales y métodos.

En el PCR de Flavivirus no hubo amplificación de productos de PCR en alguna de las muestras evaluadas (Figura 40A). Mientras que en el PCR de Alphavirus se obtuvo amplicones de alrededor 300 pb en todas las muestras, y cuyos tamaños fueron inferiores al control positivo de 434 pb (Figura 40B).

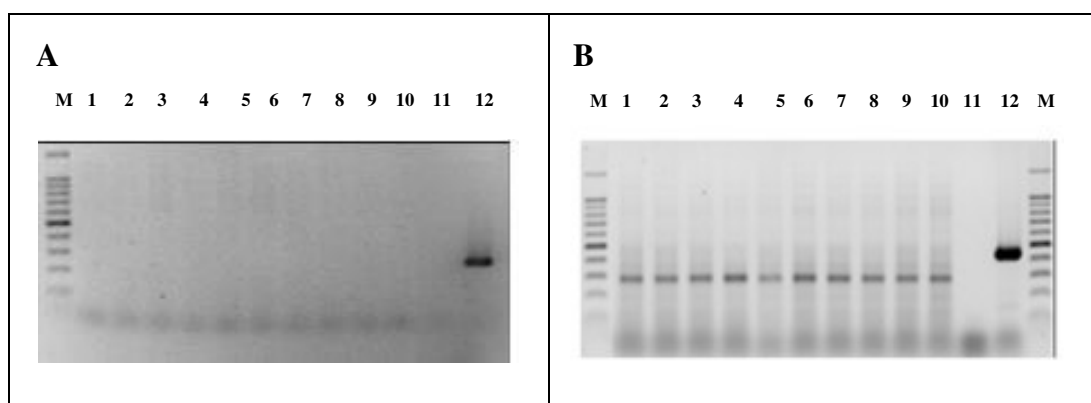


Figura 40. Análisis del PCR para la identificación de Flavivirus **(A)** y de Alfavirus **(B)**. Línea 1-10, muestras con ligero CPE; línea 11, control negativo; línea 12, control positivo. M, marcador de 100 pb.

Se realizó la reacción de secuenciamiento de los productos de PCR obtenidos usando ambos primers del PCR de Alfavirus para confirmar la identidad de los amplicones. Se siguió el protocolo de Secuenciamiento ya mencionado anteriormente.

***Chlorocebus sabaesus* isolate sab SN120 cytochrome b (cytb) gene, partial cds; mitochondrial**

Sequence ID: [gb|JX983828.1|](#)

Length: 1140 Number of Matches: 1

Related Information

Range 1: 910 to 1017

Score 202 bits (105) Expect: 5e-49()

Identities: 107/108(99%) Gaps: 0/108(0%)

Strand: Plus/Plus

Features:

```
Query 2 ATCCCCACACTTCATAATTCCAACAACAAGCATAATATTCGGCCCACTTAGCCAATC 61
      |||
Sbjct 910 ATCCCCACACTTCATAATTCCAACAACAAGCATAATATTCGGCCCACTTAGCCAATC 969

Query 62 CTATTCTGATTCTTAATTACAACCTATTAACCCTCACCTGGATAGGA 109
      |||
Sbjct 970 CTATTCTGATTCTTAATTACAACCTATTAACCCTCACCTGGATCGGA 1017
```

Figura 41. Identificación de amplicón obtenidos en el PCR de Alfavirus por identidad nucleotídica en el Genbank.

Las secuencias fueron editadas usando el Sequencher y comparadas en el Genbank usando el BLASTn. El resultado arrojó un 99% de identidad con la secuencia de *citocromo b* de *Chlorocebus sabaesus* “mono verde africano” (Figura 41), la cual derivó de las células Vero 76 donde fueron inoculadas las muestras.

V. DISCUSIÓN

VI.1 Extracción de DNA

La calidad y cantidad del DNA extraído a partir de pequeños volúmenes de sangre es indispensable para la identificación molecular de fuentes de alimentación en mosquitos hematófagos. El proceso de extracción ha sido desarrollado anteriormente usando kits, soluciones de fenol-cloroformo, y soluciones de lisis que contienen sales de guanidina y detergentes (Molaei et al., 2006; Ngo y Kramer, 2003; Abassi et al., 2009). De las mencionada anteriormente, las sales de guanidina son algunas de las más fuertes denaturantes de proteínas y exitosamente empleadas en aislar DNA y RNA de diferentes fuentes (Chirgwin et al., 1979; McCabe et al., 1987). Sin embargo, algunos kits de extracción de DNA, como el de Qiagen o HOTshot (Martínez-de la Puente et al., 2013), han demostrado incrementan la eficiencia de extracción del DNA en comparación de los otros métodos convencionales. En consecuencia, para estudios de identificación de fuente de alimentación del vector debe considerarse continuamente la eficiencia en el método de extracción en uso.

En la presente tesis se logró extraer DNA de pequeñas cantidades de sangre de algunos vertebrados (1-5 μ L), usando la solución de lisis de DNAzol BD (detergente-guanidina) y precipitando el DNA mediante el reactivo poliacrilcarrier, obteniéndose una mayor cantidad de DNA a partir de la sangre de aves que en la de mamíferos. Esto es debido a la presencia de núcleo en los eritrocitos de aves, a diferencia de los eritrocitos de mamíferos que carecen de núcleo. Algunos autores (Smith y Burgoine, 2004) evidenciaron un comportamiento similar al extraer DNA de sangre de fuentes de animales silvestres como el de aves, anfibios y peces usando tarjetas del tipo FTA (Del inglés Flinders Technology Associates) o sangre directa que poseen eritrocitos nucleados. Adicionalmente se debe considerar que el exceso de DNA en una muestra puede ocasionar problemas en la amplificación de un marcador en particular, siendo necesario diluir las cantidades de DNA en el PCR o considerar menor volumen del mismo.

VI.2 PCR de *citocromo b*

La técnica de PCR, basada en la amplificación de regiones del gen mitocondrial de *citocromo b*, para la detección de fuentes de sangre de los vertebrados empleados: mamíferos, aves y reptiles (Molaei et al., 2006), (Cicero y Johnson, 2001), (Ngo y Kramer, 2003), (Cupp et al., 2004) fue exitosamente estandarizada en este estudio de acuerdo a modificaciones en algunos parámetros de PCR como la temperatura de alineamiento : 58 °C, 53 °C y 50 °C respectivamente; y la concentración de cloruro de magnesio (2 mM-2,5 mM) (Figuras 11-21).

Los productos de PCR obtenidos fueron de 780 pb, 508 pb y 280 pb para el PCR de *citocromo b* de mamíferos, aves y reptiles respectivamente. Sin embargo, se evidencio una banda extra de 280 pb al amplificar DNA de *Gallus gallus* con los primers de aves, (Figura 15). Posteriormente se determinó que dicha banda es resultado de que uno de los primers consenso de aves, que presenta en algunas posiciones de su secuencia varias posibles bases (Kwok et al., 1990), se unió adicionalmente a una región interna del producto de PCR de 508 pb de *Gallus gallus* (Figura 19).

Las condiciones evaluadas de PCR para cada primers de aves, mamíferos y reptiles permitieron detectar pequeñas cantidades de DNA 10 pg, 100 pg y 100 pg respectivamente, las cuales se encuentran en mosquitos hematófagos pequeños como *Anopheles* spp. Posiblemente la razón por la disminución de la visualización de la señal de PCR por debajo de tales concentraciones de DNA es por la creciente insensibilidad de la amplificación del *citocromo b* para detectar tales concentraciones en progresivo proceso de dilución, así como de la degradación del DNA del vertebrado. Otros autores, como Abassi et al., 2009 desarrollaron un ensayo de PCR seguido por una Hibridización lineal reversa que permitió detectar hasta 0.01 pg de DNA de vertebrados presentes en el abdomen de Flebotominos de los géneros *Phlebotomus* y *Lutzomia*.

El PCR de *citocromo b* de mamíferos amplificó solamente las muestras de DNA de los mamíferos evaluados, mientras que el PCR usando los primers de

aves amplificó además de las muestras de aves, algunas de mamíferos. La amplificación de muestras de otra clase taxonómica se produjo debido a que las secuencias de los primers de aves se anclan en regiones conservadas del gen codificante de *citocromo b* y regiones conservadas del RNA de transferencia treonina, presente en secuencias de aves y una variedad de vertebrados (Sorenson et al., 1999), como mamíferos, reptiles, anfibios y peces.

La presencia de 2 bandas en la muestra de DNA de gallina fue ocasionada porque la secuencia de uno de los primers (reverse) contiene varias sustituciones comparada a la secuencia de alineamiento del DNA mitocondrial de gallina, por lo que ocasionó la formación de productos de amplificación inespecíficos. La secuencia nucleotídica obtenida de uno de los primers (forward) generó una señal más clara que el primer reverse durante el secuenciamiento, esta característica ha sido reportada previamente al analizar secuencias mitocondriales (Parson et al., 1998). A pesar de ello, las secuencias de ambas cadenas fueron determinadas y la secuencia consenso fue analizada y permitió la identificación del origen de la muestra.

La técnica de PCR del *citocromo b* permitió la identificación de fuentes de sangre en los vertebrados evaluados. El *citocromo b* ha sido utilizado para la identificación del DNA mitocondrial de hospederos mamíferos o aves (Ngo y Kramer, 2003). En este estudio se optimizó el uso de 2 set de primers para la identificación de fuentes de sangre por su representación taxonómica en la base de datos nucleotídicas.

Los controles negativos que sólo tenían agua libre de nucleasas como templado, no evidenciaron amplificación alguna, demostrando la ausencia de amplificación de falsos positivos de DNA de vertebrados, que podría estar presente en la glicerina de la Taq Polymerasa.

Los productos generados permitieron identificar al hospedero o algún espécimen relacionado (Tabla 12), como ocurrió con los loros del género *Aratinga* *mitrata* y *Aratinga erythrogenys* cuya identidad nucleotídica fue de 95% con secuencias de *Aratinga leucophthalmus*, debido a la ausencia de secuencias de

citocromo b de tales especímenes en el Genbank y además por las dificultades en establecer las relaciones filogenéticas dentro del género *Aratinga* usando genes nucleares y mitocondriales (Schirtzinger et al., 2012)

VI.3 Identificación de fuentes de alimentación en los mosquitos

Se identificaron 125 especímenes a nivel de especie usando las claves morfológicas (Consoli, 1998), sin embargo, no se lograron identificar alrededor de 345 mosquitos debido a la pérdida de partes de la anatomía de los mosquitos durante la colecta.

Por otro lado, se observaron algunos animales domésticos y silvestres alrededor de las zonas de colecta, que fueron usados como controles para la validación y optimización en la identificación de hospederos a partir del secuenciamiento del PCR de *citocromo b*, y que podrían ser presuntas fuentes de alimentación de los mosquitos colectados.

La cantidad de DNA obtenida en mosquitos pequeños como *Cx. Melanoconiom* spp. y *Anopheles* spp. fue entre 40-55 ng. Anteriormente Mukabana et al., 2002 estimaron que la cantidad de DNA humano en *An. gambiae* estuvo entre 2-80 ng, mientras que Kent y Norris, 2005 reportaron 50 ng de DNA. Además, es conocido que los anophelinos tienden a concentrar los eritrocitos durante su alimentación en 1.2 a 2 veces el hematocrito humano normal (Vaughan, 1991), incrementando la cantidad de DNA en el intestino y la probabilidad de obtener un amplicón. En tanto la cantidad de DNA fue mayor en los demás culícidos, usándose entre 100-150 ng de DNA para cada reacción de PCR tal como lo realizaron Kent y Norris, 2005.

Se obtuvieron amplicones en el 92% (n = 115) de los mosquitos evaluados con algunos de los primers de vertebrados (mamíferos, aves y/o reptiles). Sin embargo, en el 8% (n = 10) no se obtuvieron amplicones, correspondiente a *Cx. (Mel) vomerifer* (n = 3), *Och. fulvus* (n = 3), *M. humeralis* (n = 1), *Ps. albigena* (n = 1), *Oc serratus* (n = 1), *Cx. (Aedius) amazonensis* (n = 1). Otros autores como Lee et al., 2002 obtuvieron 85 % de resultados positivos usando PCR con

mosquitos capturados en campo, Thiermann et al., 2011 identificó 92 % de las fuentes de alimentación usando un ensayo de microesferas y secuenciamiento. La eficiencia del análisis de las fuentes de alimentación varía ampliamente entre estudios, Martínez-de la Puente et al., 2013 demostró que la eficiencia de la amplificación era fuertemente disminuida por el estado de digestión de los mosquitos (entre 5 a 7 de acuerdo con la metodología de Sella, 1920), similares resultados fueron obtenidos por Tuten et al., 2012.

Las causas de la ineficiencia del PCR al amplificar algunas muestras posiblemente se produjo por la inhabilidad de los primers genérico de *citocromo b* de amplificar el DNA, la cantidad insuficiente del DNA del hospedero en el abdomen del mosquito, así como por los procesos de digestión de los mosquitos mitad grávidos o sub-grávidos, lo que pudo denaturar el DNA, sumado a ello el tiempo en que estos mosquitos permanecieron dentro de las trampas antes de su procesamiento.

La presencia de mayor número de amplicones (n = 130) que el número de muestras positivas de PCR (n=115) fue debido a que los primers de aves pueden también reconocer secuencias de algunos vertebrados, y del mismo modo, los primers de reptiles pueden amplificar también secuencias de DNA de aves y mamíferos (Cupp et al., 2004) tal como se evidenciaron en los resultados (Figura 30). Razón por la cual el flujograma de trabajo para la identificación de fuentes de alimentación en esta tesis se realizó primero con el PCR de aves y mamíferos de las muestras. El PCR usando los primers de reptiles fue destinado a aquellas muestras que no amplificaron con algunos de los primers de aves o mamíferos, así como para reconfirmar la identidad del hospedero o fuente mixta de alimento en el mosquito. Si bien los primers de cada grupo o clase taxonómica deberían amplificar tales grupos de manera específica, estos resultan más útiles si pueden generar amplicones en un amplio rango de vertebrados para ser sometidos a secuenciamiento (Kent, 2009) y generar una mayor cantidad de información sobre todo en aquellos vertebrados que no se encuentran en la base de datos del Genbank.

La información contenida en las secuencias de nucleótidos de los fragmentos de *citocromo b* permitió la identificación de las especies hasta el nivel más cercano de clase de vertebrado. Se pudo llegar a identificar correctamente a nivel de especie una muestra desconocida solo cuando la secuencia de tal especie se encontraba en la base de datos del Genbank, en el caso contrario solo se pudieron encontrar valores bajos de similitudes por organismos relacionados como ocurrió con *Choloepus didactylus* y *Chloropus spp.* (Parson et al., 2000)

La presente tesis muestra la asociación entre hospederos y mosquitos en la Cuenca amazónica del Perú. *Ps. albigenu*, *Och serratus* y *Och fulvus* representaron el 79% del total de mosquitos evaluados. Anteriormente Jones et al., 2004, llegó a obtener de las mismas especies un 70% del total de mosquitos usando trampas de cebo humano en Puerto Almendras, Iquitos.

Psorophora albigenu fue el mosquito más abundante con presencia de sangre en el abdomen, constituyendo el 57% de la población de mosquitos colectada en el estudio. Esta especie presentó una mayor preferencia antropofílica (94%) seguida por ratas espinosas, vacas y aves garrapatera de pico liso. En Brasil, Forattini et al., (1987) usando antisueros identificó en *Ps. albigenu* también diferentes fuentes de alimentación provenientes de humano (78,7%), perro (7,1%), vaca (7,1%) y aves (7,1%); Kleint et al., 1992 reportó que *Ps. albigenu* es uno de los mosquitos predominantes en el bosque que se alimenta de humanos, y que además se encuentra cerca de casas que tienen arboles a sus alrededores. Pauvalid-Correa, 2010, evidenció antropofilia en 96.7% de los mosquitos de *Ps. albigenu* capturados en Pantanal, al sur de Brasil. En la Cuenca del Amazonas del Perú también se demostró la preferencia de *Ps. albigenu* hacia humanos usando principalmente trampas de cebo humano (Jones et al., 2004).

Además de DNA humano se encontró DNA de múltiples vertebrados (incluyendo en el mismo mosquito que tenía DNA de humano y perro), como vaca, perro, rata espinosa *Proechimys brevicauda* y un ave *Crotophaga ani*. *Crotophaga ani* es uno de los hospederos de arbovirus como Oropouche y Mayaro en la región amazónica de Brasil (Degallier et al., 1992). El patrón variado

de alimentación de *Ps. albigenu* fue también detectado recientemente en varias áreas de protección ambiental en Brasil (Do Santos et al., 2012).

Esta preferencia de alimentación de nuestro estudio tiene un soporte por el hecho de que *Ps. albigenu* es considerado un vector susceptible y moderadamente competente del virus de Encefalitis Equina Venezolana (VEEV) y del virus de Encefalitis Equino del Este (EEEV) (Turrel et al., 2000, 2005, 2008) (Tabla 15), sugiriendo además que *Ps. albigenu* tiene un probable rol como vector puente en la transmisión de alfavirus entre hospederos animales primarios y los humanos, así vector enzootico debido a sus preferencias de alimentación por mamíferos pequeños.

Och. serratus y *Och. fulvus* tuvieron preferencias de alimentación antropofílica y peridomésticas (mamíferos domésticos y un ave). Este comportamiento de alimentación variado o ecléctico había sido reportado anteriormente por Consoli et al., 1994. *Och. serratus* y *Och. fulvus* han sido positivos para el aislamiento de alfavirus (Travassos et al., 2001; Turrel et al., 2005) y Orthobunyavirus (Pinheiro, 1962, Vasconcelos et al., 2011). *Och. fulvus* específicamente ha demostrado ser un vector susceptible a la infección de VEEV y EEEV en estudios de laboratorio (Turrel et al., 2000, 2008) (Tabla 15). Debido a su comportamiento de alimentación de *Och. serratus* y *Och. fulvus*, estas especies podrían ser considerados potenciales vectores secundarios o vectores puente para la transmisión de arbovirus en la Cuenca del Amazonas.

La presente tesis identificó por primera vez que *Cx. (Mel.) vomerifer* se alimentó de ratas espinosas como *Proechimys quadriplicatus* y *Proechimys cuvieri* en la Cuenca del Amazonas en Perú. Previamente, estas especies de roedores habían sido descritas en el Departamento de Loreto-Perú (Patton et al., 2000, Pacheco et al., 2009), y han sido reconocidas basadas en características morfológicas, cromosómicas y moleculares. Las relaciones filogenéticas de las ratas espinosas en la Amazonia basada en *citocromo b* ha permitido separar clados entre especies basado en un buen soporte monofilético (Da Silva, 1998; Patton et al., 2000), así como las secuencias obtenidas de la sangre de mosquitos en esta tesis (Figura 36). Las ratas espinosas *Proechimys* spp. (Familia

Echimyidae) han sido consideradas los hospederos enzooticos naturales de virus de encefalitis equina Venezolana (VEEV) (Barrera et al, 2002), las cuales desarrollan poca o ninguna enfermedad después de la infección reflejando la selección para resistencia del hospedero y posible atenuación viral (Haydon, 2002; Carrara et al., 2005). Anteriormente en la Cuenca del Amazonas del Perú se aisló una variante enzoótica de VEEV (IIID) en humanos, *Cx. (Mel) spp.* y *Proechimys spp.* (Aguilar et al., 2004), mientras que en Brasil se aisló un alfavirus Pixuna a partir de *Proechimys guyannensis* (Shope et al., 1964).

Mientras tanto, en el único espécimen de *Cx. (Mel.) durni* se encontró DNA de un perezoso y un humano. Por un lado, los perezosos han sido considerados como hospederos para arbovirus como virus de la Encefalitis de San Luis, virus Oropouche y virus de encefalitis equina Venezolana (Seymour, 1985); y por otro lado, *Cx. (Mel.) durni* ha sido asociado con el virus de encefalitis equina Venezolana y el virus de encefalitis del Este (Turell et al., 2006; Aitken, 1972; Walder et al., 1984).

La presencia de múltiples fuentes de alimentación en un mosquito como la encontrada en *Ps. albigenu* y *Cx (Mel.) durni*, puede ser ocasionada por comportamientos defensivos del hospedero frente a la picadura del mosquito, la cual ocurre mayormente en mamíferos grandes. Esto permite que el mosquito busque otras fuentes de alimentación, y pueda actuar como vector puente de virus diseminando la infección hacia un nuevo hospedero, incapaz de replicar el virus en el ciclo enzootico natural pudiendo permitir la aparición de ciclos epizoóticos virales.

Solo se detectó en *Cx. (Mel.) portesi* y *Cx. (Mel.) occosa* DNA de gato y humano respectivamente. Esta pequeña evidencia de comportamiento peridoméstico de alimentación de *Cx. (Mel) spp.* ha sido corroborado con estudios realizados en Brasil (Forattini, 1987). Adicionalmente, ambos mosquitos han sido identificados como vectores enzoóticos de variantes de VEEV en Trinidad (Aitken, 1972) y Panamá (Galindo, 1971).

Nuestros datos son consistentes con lo que ha sido previamente reportado en la literatura para *Cx. (Mel.) spp.* Considerando las preferencias de alimentación encontradas en este estudio hacia ratas espinosas de este grupo de mosquitos soportan el posible rol de estos hospederos y mosquitos en el ciclo enzoótico de la transmisión de los Alfavirus en la Cuenca del Amazonas en el Perú.

Es el primer reporte que identifica a una rata espinosa *Proechimys brevicauda* como fuente de alimentación de *Cx. (Aedinus) amazonensis* en Perú, el cual difiere de las preferencias por ave, vaca y perro encontradas en *Cx. (Aedinus) amazonensis* en Brasil (Forattini et al., 1987) pero soporta su preferencia por animales homeotérmicos (Tempelis y Galindo, 1975). Esta diferencia se pudo ocasionar por la disponibilidad del hospedero, puesto que este espécimen en nuestro estudio fue colectado en el bosque usando trampas luz colocadas 3 metros sobre el suelo, mientras que en el otro estudio las trampas de luz fueron colocadas en zonas peridomésticas.

Un comportamiento de alimentación antropofílica fue detectado en *Mansonia humeralis*, *Ps. cingulata* y anofelinos *An. benarrochi* y *An. oswaldoi*. Reportes similares usando trampas de cebo humano fueron obtenidos en Puerto Almendras-Perú (Turrel et al., 2008; Jones et al., 2004), y en Brasil (Tadei, 1996).

Tabla 15. Identificación de Fuentes de alimentación de mosquitos colectados durante enero-marzo 2009 y virus asociados con estos mosquitos. (EEEV: virus de Encefalitis Equina del Este, TROV: Trocara virus, VEEV: virus de Encefalitis Equina Venezolana, GpCV: virus del Grupo C, MURV: virus Murutucu, GUAV: virus Guaroa virus, UnaV: virus Una). 2 especímenes de mosquitos ^(a) con doble fuente de alimentación identificado (*).

| Mosquitos | Asociado a arbovirus | <i>Homo sapiens</i> | <i>Bos taurus</i> | <i>Cannis familiaris</i> | <i>Proechimys brevicauda</i> | <i>Proechimys quadriplicatus</i> | <i>Proechimys cuvieri</i> | <i>Gallinula chloropus</i> | <i>Felis catus</i> | <i>Choloepus spp.</i> | <i>Crotophaga ani</i> | <i>Sus scrofa</i> |
|------------------------------------|----------------------|---------------------|-------------------|--------------------------|------------------------------|----------------------------------|---------------------------|----------------------------|--------------------|-----------------------|-----------------------|-------------------|
| <i>Ps. albigena</i> | EEEV, VEEV | 64* | 1 | 1* | 1 | | | | | | 1 | |
| <i>Ps. cingulata</i> | VEEV | 3 | | | | | | | | | | |
| <i>Och. serratus</i> | TROV OROV | 16 | | 1 | | | | 1 | | | | 1 |
| <i>Och. fulvus</i> | VEEV, EEEEV, UnaV | 6 | 2 | | | | | | | | | |
| <i>Cx.(Mel.) vomerifer</i> | VEEV, GpCV | | | | | 1 | 1 | | | | | |
| <i>Cx. (Aedinus) amazonensis</i> | | | | | 1 | | | | | | | |
| <i>Cx. (Mel.) occosa</i> | VEEV, MURV, GUAV | 1 | | | | | | | | | | |
| <i>Cx. (Mel.) portesi</i> | VEEV Mucambo | | | | | | | | 1 | | | |
| <i>Cx.(Mel.) dunni^a</i> | EEEV VEEV | 1* | | | | | | | | 1* | | |
| <i>Mansonia humeralis</i> | | 4 | | | | | | | | | | |
| <i>Anopheles oswaldoi</i> s.l | | 5 | | | | | | | | | | |
| <i>Anopheles. benarrochi</i> | | 2 | | | | | | | | | | 1 |

VI.4 Aislamiento viral

No se logró aislar virus en los cefalotórax de los mosquitos alimentados de ciertos hospederos, para incriminarlos como vectores virales y soportar el rol del hospedero en la transmisión de arbovirus. La ausencia de un marcado efecto citopático en las muestras pudieron deberse a factores como el número de mosquitos evaluados, la ausencia de periodos enzoóticos o epizoóticos en la zona la colecta, la probable perdida de infectividad de virus por las condiciones climáticas (temperatura, humedad) durante la colecta en el campo, así como la ausencia del uso de modelos animales para una mejor adaptación del virus en el aislamiento viral.

A pesar de la vigilancia de arbovirus a partir de mosquitos culícidos durante casos de arbovirosis humano/animal, el índice de aislamiento viral en cultivo celular o de detección de RNA viral es relativamente bajo o nulo, tal como los resultados en esta tesis. En Estados Unidos, se reportaron bajos índices de aislamiento viral durante la vigilancia de West Nile en zonas endémicas usando cultivo celular (Andreadis et al., 2001) o RT-PCR (White et al., 2001); en Paraná-Brasil, no se logró identificar virus alguno luego de un brote de encefalomiелitis (Fernández et al., 2000), así como en el sur Pantanal (Pauvolid-Correa, 2010); en Iquitos-Perú, se detectaron arbovirus sólo en el 1,09% de la población de mosquitos analizados (Turell et al., 2005).

En ciertas localidades (Jeberos, Esperanza y San Benito) de los distritos del presente estudio como Lagunas y Yurimaguas, pertenecientes a la Provincia de Alto Amazonas en el Departamento de Loreto, se han reportado anteriormente casos de VEEV enzoóticos (ID) severos y letales (Vilcarromero et al., 2009, 2010) por lo que no se descarta que en la otra población de mosquitos no alimentados colectados durante enero-marzo 2009 exista la posibilidad de identificar y aislar arbovirus. Por lo que próximos estudios serán destinados a evaluar tal población de mosquitos, y además realizarse exhaustivos estudios de vigilancia de arbovirosis e identificación de fuentes de alimentación en los mosquitos de tales localidades con la finalidad de conocer mejor el riesgo y ecología de transmisión para Arbovirus como VEEV, para posteriores medidas de control.

VI.CONCLUSIONES

- La técnica de PCR de *citocromo b* fue exitosamente estandarizada para la identificación de fuentes de alimentación en mosquitos hematófagos.
- La técnica del PCR de *citocromo b* logro la identificación de las fuentes de alimentación en el 92 % de los mosquitos evaluados.
- *Ps. albigena*, *Och. serratus* y *Och. fulvus* presentaron un comportamiento de alimentación ecléctico.
- *Cx. (Mel.) occosa*, *Cx. (Mel.) dunni* y *Cx. (Mel) portesi* tuvieron un comportamiento mamalofílico.
- *Ps. cingulata*, *Mansonia humeralis*, *An. benarrochi* y *An. oswaldoi* tuvieron un comportamiento de alimentación antropofílico
- No se aisló virus por cultivo celular en alguno de los mosquitos con evidencia de sangre en el abdomen.

VII. RECOMENDACIONES

- Incrementar la cantidad de mosquitos identificados a nivel de especie con evidencia de sangre en el abdomen para identificación de fuentes de alimentación.
- Mantener adecuadamente la cadena de frío de los mosquitos colectados en el campo, principalmente para el aislamiento viral.
- Utilizar métodos moleculares en la identificación de RNA viral presente en los mosquitos colectados.

VIII. ANEXOS

ANEXO 1

PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVOS

Medio de crecimiento (E-MEM 10% FBS)

| COMPONENTE | CONCENTRACIÓN | VOLUMEN |
|-------------------------------|---------------|---------|
| EMEM w/L- Glutamine | 1X | 500 mL |
| NEAA | 100X | 5 mL |
| Piruvato de Sodio | 100 Mm | 5 mL |
| Antibiótico / Antimicótico | 100X | 5 mL |
| FBS | 1X | 50 mL |

Medio de mantenimiento (E-MEM 2% FBS)

| COMPONENTE | CONCENTRACIÓN | VOLUMEN |
|-------------------------------|---------------|---------|
| EMEM w/L- Glutamine | 1X | 500 mL |
| NEAA | 100X | 5 mL |
| Piruvato de Sodio | 100 mM | 5 mL |
| Antibiótico / Antimicótico | 100 X | 5 mL |
| FBS | 1X | 10 mL |

Medio de lavado

| COMPONENTE | CONCENTRACIÓN | VOLUMEN |
|-------------------------------|---------------|---------|
| PBS estéril | 1X | 500 mL |
| Antibiótico / Antimicótico | 100X | 5 mL |

ANEXO 2

SUBCULTIVO DE LÍNEAS CELULARES Vero 76 Y C6/36 PARA PASAJES Y PREPARACIÓN DE PLACAS

Pasaje de células Vero 76

- Mantener las condiciones estériles y observar la morfología celular todo el tiempo.
- Escoger un frasco de cultivo con una monocapa confluyente de células.
- Descartar el medio de crecimiento del frasco 175 cm² hacia una botella estéril.
- Enjuagar la monocapa de células con 10 mL de PBS esteril con 1% antibiótico-antimicótico. Mover circularmente el frasco y decantar el medio hacia una botella estéril.
- Adicionar a las células 4 mL de tripsina, y luego decantar cuidadosamente.
- Tripsinizar la monocapa agregando 4 mL de tripsina atemperada (37 °C), luego descartar la tripsina.
- Incubar las células por aproximadamente 10 a 15 minutos a 37 °C, o hasta que la monocapa comienza a disgregarse de la superficie del frasco.
- Golpear suavemente el frasco contra la palma de la mano para desprender completamente las células, y agregar 10 mL de medio de crecimiento (E-MEM 10% FBS).
- Pipetear hacia arriba y abajo 5-10 veces para romper los cúmulos de células.
- Dividir el inóculo de acuerdo con el radio de multiplicación de Vero 76: 1/3
- Transferir la suspensión celular hacia un nuevo frasco T-175.
- Agregar 50 mL de medio de crecimiento hacia el nuevo frasco.

- Rotular apropiadamente el número de nuevos frascos con el nombre de la línea celular, el pasaje, radio de multiplicación y la fecha.
- Incubar a 5% de CO₂ y 37 °C por 3-4 días.

Pasaje de células C6/36

- Mantener las condiciones estériles y observar la morfología celular todo el tiempo.
- Escoger un frasco de cultivo con una monocapa confluyente de células.
- Descartar el medio de crecimiento del frasco 175cm² hacia una botella estéril.
- Escrapear la monocapa, agregar 10 mL de medio de crecimiento. Remover las células pipeteando hacia arriba y abajo 5-10 veces (no usar tripsina).
- Aspirar y transferir 2 mL de las células hacia un nuevo frasco T-175 (1:5 radio de propagación).
- Adicionar 48 mL de medio de crecimiento hacia el nuevo frasco.
- Rotular apropiadamente el número de nuevos frascos con el nombre de la línea celular, el pasaje, radio de multiplicación y la fecha.
- Incubar a 5% CO₂ y 28 °C por 3-4 días.

Preparación de placas de células C6/36

- Escoger un frasco de cultivo con una monocapa confluyente de células.
- Descartar el medio de crecimiento del frasco 175 cm² hacia una botella estéril.
- Escrapear la monocapa, agregar 10 mL de medio de crecimiento. Remover las células pipeteando hacia arriba y abajo 5-10 veces para romper los cúmulos de células.
- Preparar una dilución 1/10 de la suspensión celular en tryphan blue.

- Limpiar el hemocitómetro con alcohol antes y después de usarlo.
- Usar 10 μL de la dilución y contar el número de células usando el hemocitómetro, contando solo los 4 cuadrantes. No considerar las células localizadas en los bordes de tales cuadrantes.
- Calcular el promedio del número de células por cuadrante.
- Usar la fórmula para encontrar el volumen total de células en $C6/36 = 3 \times 10^5$ células/mL
- Completar el volumen total requerido con medio de crecimiento y luego agregar la suspensión celular.
- Distribuir 0.5 mL / pozo en las placas de 24 pozos de cultivo celular
- Incubar las placas a 28°C , 5% de CO_2 por 2-3 días.

ANEXO 3

PREPARACIÓN DE FLUIDOS ASCÍTICOS HIPERINMUNES DE RATÓN

- El procedimiento dura varias semanas e involucra inmunizaciones de varios ratones hembras de 6 a 8 semanas para la producción de cada antisuero para cada arbovirus.
- El día 0, inocular intraperitonealmente (IP) 0,2 mL of Adyuvante complete de Freud (CFA) y subcutáneamente (SC) 0,2 mL de Antígeno viral de cerebro de ratón lactante (V-AgSMB) respectivo. Los ratones deben ser observados diariamente.
- En el día 3 ó 4 inocular IP 0,3 mL y SC 0,1 mL de Antígeno viral de cerebro de ratón lactante respectivo.
- En el día 21, preparar la emulsión adyuvante-antígeno mezclando volúmenes iguales de CFA y V-AgSMB, usando un mezclador de doble entrada de jeringas. Luego, inocular a cada ratón 0,3 mL IP y 0,1 mL SC de la emulsión.
- En el día 28, inocular a cada ratón el V-AgSMB 0,3 mL IP y 0,1 mL SC.
- En el día 35, inocular Sarcoma 180, 0,4 mL IP.
- Las células de Sarcoma 180 deben ser propagadas en ratones adultos, cosechadas y transferidas a otro ratón para estimular la producción de antisuero en los ascites del ratón
- Luego de 7-10 días, los abdómenes de los ratones se hincharán con fluido ascítico. Colectar el fluido con la ayuda de una jeringa 18. El procedimiento puede ser repetido 2 veces cada 4-7 días.
- Transferir el fluido hacia un tubo de 50 mL y centrifugar a 10000 rpm/ 30 minutos a 4 °C. Colectar el sobrenadante hacia un nuevo tubo de 50 mL esteril y hacer alícuotas de 1 mL en crioviales previamente rotulados.
- Almacenar a -20 °C.

ANEXO 4

PRIMERS DESTINADOS A LA AMPLIFICACION DE *CITOCROMO b* DE VERTEBRADOS

| Primers | Secuencias 5-3 | Referencia |
|---------------------|------------------------------|------------------------|
| Aves Fw | GACTGTGACAAAATCCCNTTCCA | Cicero y Johnson, 2001 |
| Aves Rv | GGTCTTCATCTYHGGYTTACAAGAC | Cicero y Johnson, 2001 |
| Mamíferos Fw | CGAAGCTTGATATGAAAAACCATCGTTG | Ngo y Kramer, 2003 |
| Mamíferos Rv | TGTAGTTRTCWGGGTCHCCTA | Ngo y Kramer, 2003 |
| Reptiles Fw | CCCCTCAGAATGATATTTGTCCTC A | Cupp et al., 2004 |
| Reptiles Rv | GCH GAYACHWVHHYHGCHTTYTCH TC | Cupp et al., 2004 |

Donde:

N = ACGT W= AT Y = CT

H = ACT R= AG

ANEXO 5

EXTRACCIÓN DE RNA

- Se extrajo RNA a partir del sobrenadante de las células inoculadas (p3) con las suspensiones de mosquito, que estaban siendo analizadas por cultivo celular, de acuerdo con el Kit de extracción de RNA de Qiagen:
- Añadir 140 μ L de cada muestra a un tubo de microcentrifuga que contenía 560 μ L del buffer de extracción AVL. Se mezcló en un vortex durante 15 segundos.
- Incubar a temperatura ambiente (15-25°C) durante 10 min para lisar las posibles partículas virales
- Añadir 560 μ L de etanol (96-100%) a la muestra y mezclar en un vortex durante 15 s. Después de mezclar, centrifugar brevemente el tubo para eliminar las gotas del interior de la tapa.
- Cuidadosamente aplicar 630 μ L de la solución de la etapa anterior a la columna de centrifugación QIAamp Mini (sobre un tubo de colecta de 2 mL) sin mojar el borde. Cerrar el tapón y centrifugar a 6000 g (8000 rpm) durante 1 minuto.
- Colocar la columna de centrifugación QIAamp en un tubo de colecta limpio de 2 mL y desechar el tubo que contiene el filtrado.
- Abrir cuidadosamente la columna QIAamp y aplicar el volumen restante de la mezcla de búfer / etanol muestra / lisis a la columna sin mojar el borde. Cerrar la tapa y centrifugar a 6.000g (8000 rpm) durante 1 minuto.
- Colocar la columna de centrifugación QIAamp en un tubo de colecta limpio de 2 mL y desechar el tubo que contiene el filtrado.
- Abrir cuidadosamente la columna QIAamp giro Mini y añadir 500 μ L de Buffer de lavado (AW1). Cerrar la tapa y centrifugar a 6.000g (8000 rpm) durante 1 minuto.

- Colocar la columna de centrifugación QIAamp en un tubo de colecta limpio de 2 mL y desechar el tubo que contiene el filtrado.
- Abrir cuidadosamente la columna QIAamp giro Mini y añadir 500 µL de Buffer de lavado 2 (AW2). Cerrar el tapón y centrifugar a toda velocidad (20.000 g, 14 000 rpm) durante 3 minutos.
- Colocar la columna de centrifugación QIAamp en un tubo limpio de 2 mL de colección y centrifugar a toda velocidad (20.000 g; 14000 rpm) durante 1 minuto.
- Colocar la columna de centrifugación QIAamp en un tubo de centrífuga de 1,5 mL limpio. Desechar el tubo de colecta que contiene el filtrado.
- Abrir cuidadosamente la columna de centrifugación QIAamp y añadir 60 µL de tampón de elución (AVE) a temperatura ambiente.
- Cerrar la tapa y se incuba a temperatura ambiente durante 1 min. Centrifugar a 6000 g (8000 rpm) durante 1 minuto.
- Extraído el RNA está ahora listo para aplicaciones posteriores. El ARN viral es estable durante un máximo de un año cuando se almacena a -20 °C o -70 °C

ANEXO 6

PREPARACIÓN DE REACTIVOS DE PCR

dNTPs 2.5mM (1 mL, Promega)

25 μ L dATP 100mM + 25 μ L dGTP 100 mM + 25 μ L dTTP 100 mM + 25 μ L dCTP 100 mM + 900 μ L de agua libre de nucleasas.

RT-Primer 5 pmol/ μ L (1 ml, CM3W)

10 μ L Rv-Primer CM3W 500 pmol/ μ L + 990 μ L Buffer TE

RT-Buffer (SSII) para 200 Rx (1400 μ L)

800 μ L 5X Buffer (Y00146 ó Y02321) + 400 μ L DTT 0.1 M (Y00147) + 200 μ L dNTP 10 mM

Alicuotar en 7 viales of 200 μ L cada uno.

1X PCR Buffer 12,5 mL

2.5 mL 5X PCR Buffer-7.5mM MgCl₂ (Promega # MI88J) + 324 μ L dNTPs 10mM + 9.68 mL Nuclease Free Water

Alicuotar en viales de 994 μ L cada uno.

Primer Mix 1.5 pmol/ μ L (1mL, M2W-cM3W)

3 μ L Fw-Primer M2W 500 pmol/ μ L + 3 μ L Rv-Primer cM3W 500 pmol/ μ L + 994 μ L 1X PCR Buffer

ANEXO 7

SOLUCIONES DE TINCIÓN, TAMPÓN, GEL DE AGAROSA

TBE 10X

| COMPONENTE | CANTIDAD / Litro |
|--------------------|------------------|
| Tris base | 180,00 g |
| EDTA 0.5 M, pH 8.0 | 40,00 mL |
| Ácido bórico | 55,00 g |
| Agua destilada | 1 L |

SALB 10X

| COMPONENTE | CANTIDAD / 100 mL |
|---------------------|-------------------|
| Azul de Bromo fenol | 0,15 g |
| Xilencianol | 0,15 g |
| Naranja G | 0,20 g |
| Sucrosa | 60,00 g |
| TBE 10X | 5,00 mL |

BROMURO DE ETIDIO (10mg/mL)

| COMPONENTE | CANTIDAD / 100 mL |
|-------------------|-------------------|
| Bromuro de etidio | 1 g |
| Agua destilada | 100 mL |

GEL DE AGAROSA (2%)

| COMPONENTE | CANTIDAD / 100 mL |
|------------|-------------------|
| Agarosa | 2 g |
| TBE 1X | 100 mL |

ANEXO 8

Secuencias de *citocromo b* de controles (vertebrados)

>PP_1_CONS_Cannis familiaris

TATTTCAACTATAAGAACATTAATGACCAACATTCGAAAAACCCACCCACTAGCCAAAATGTTAATAACTCATTGACCTCCCAGCGCCGTCTAAC
ATCTCTGCTTGATGGAACCTCGGATCCTTACTAGGAGTATGCTTATTCTACAGATTCTAACAGGTTTATTCTTAGCTATGCACTATACATCGGACACAG
CCACAGCTTTTTATCATAGTACCCACATCTGCCGAGACGTTAACTACGGCTGAATATCCGCTATATGCACGCAAAATGGCGCTTCCATATCTTTATCTG
CCTATTCTACATGTAGGACGAGGCCTATATTACGGATCCTATGTATTACATAGAAACATGAAACATTGGAATTGACTATTATTCGCAACCATAGCCAC
AGCATTTCATGGCTATGTACTACCATGAGGACAAATATCATTTTGAGGAGCAACTGTAATCACTAATCTTCTCTGCCATCCCTTATATCGGAACTGA
CTTAGTAGAATGGATCTGAGGCGGCTTCTCAGTGGACAAAGCAACCTAACACGATTCTTTGCATTCCATTTTCATCTCCCTTTTCATCATCGCAGCTCTA
GCAATAGTACACTCTATTTCTACACGAAACCGGATCCAACAACCTTCAGGAATCACATCAGACTCAGACAAAATTCATTTACCCCTTACTACACAA
TCAAGGATATCTAGGAGCCTTACTCTACTCCTAATCAATATCACTAGTTTTATTTTACCTGACCTATTAGGAG

>PP_2_CONS_Equus caballus

ATGACAAACATCCGAAATCTCACCCACTAATTAATCATCAATCACTCTTTTATTGACCTACCAGCCCCCTCAAACATTTTCATCATGATGAAACTTCG
GCTCCCTCTAGGAATCTGCCTAATCTCCAATCTTAACAGGCCTATTCTAGCCATACACTACACATCAGACACGACAACCTGCCTTCTCATCCGTCAC
TCACATCTGCCGAGACGTTAACTACGGATGAATATTCGCTACCTCCATGCCAACGGAGCATCAATATTTTTATCTGCCTTCTATTACGAGGACGC
GGCCTTACTACGGCTTCTACACATTCCTAGAGACATGAAACATTGGAATCATCTACTTTTACAGTCATAGTACAGCATTATGGGCTATGCTCTAC
CATGAGGCCAAAATACCTTTTGAGGAGCAACAGTCATCAGCAACCTCTATCAGCAATCCCTACATCGGTACTACCTCGTGAGTGAATCTGAGGTG
GATTCTCAGTAGACAAAGCCACCTTACCGATTTTTGCTTTCCACTTTCATCTACCTACCTTCATCATCACAGCCCTGGTAGTCGTACATTTACTATTTCTC
ACGAAACAGGATCTAATAACCCCTCAGGAATCCCATCGATATGGACAAAATCCCATCCACCCATATATACAATTAAGACATCTAGGACTCTCC
TCCTGATCTTCTACTAATCTAGTATTATTCTCCCGACCTCCTA

>PP_3_CONS_Felis catus

AATGACCAACATTCGAAAATCACACCCCTTATCAAAATTAATCACTCATTTCATCGATCTACCACCCCTAATCTCAGCATGATGAAACTTC
GGCTCCCTTAGGAGTCTGCCTAATCTTACAATCTCACCGCCTTTTTGGCCATACACTACACATCAGACACAATAACCGCTTTTCATCAGTTA
CCACATTTGTGCGGACGTTAATATGGCTGAATCATCCGATATTACACGCCAACGGAGCTTCTATATCTTTATCTGCCTGTACATACATGATGAGGAGC
GGGAATGTACTACGGCTCTACACCTTCTCAGAGACATGAAACATTGGAATCATACTATTATTTACAGTCATAGCCACAGCTTTTATGGGATACGTCCT
ACCATGAGGCCAAATGTCCTTCTGAGGAGCAACCGTAATCACCAACCTCTGTGAGCAATCCATACATCGGGACTGAACTAGTAGAATGAATCTGAG
GGGCTTCTCAGTAGACAAAAGCCACCTAACACGATTTCTTGCCCTCCACTTCATTCTTCCATTCAATCTCAGCCTTAGCAGCAGTACACCTCTTATTC
CTTCATGAAACAGGATCTAACAACCCCTCAGGAATTACATCCGATTCAGACAAAATCCCATCCACCCATACTATACAATCAAAGACATCTAGGCTCTC
TAGTACTAGTTTTAACTCACACTACTCGCTATTTTACCAGACCTGCTAG

>PP_4_CON_Mus musculus

TTTGATGTTTTTTAGGGTCTCCTAGTATGTCTGGGAAAATAATACTAGGGTTATGAGAATTAAGAATGATTAGGATACCTAGGATATCTTTGATT
GTATAGTAGGGGTGAAATGGAATTTTATCTGCATCTGAGTTAATCTGTTGGGTTGTTTATCTGTTTCTGTTGAGGAGAGAGGAGGTGAACGATTGC
TAGGGCCGATAATAAATGGTAAGATGAAGTGGAAAGCGAAGAATCGGGTCAAGGTGGCTTTGCTACTGAGAAGCCCTCAAATTCATTGACT
AGGGTTGTTCCAAATATATGGGATGGCTGATAGGAGTTTGAATAACTGTGGCACCTCAGAATGATATTTGCTCATGGAAGGACGTAGCCTATAAAA
TGCTGTGGCTATGACTGCGAACAGTAGAAGTACTCCAATGTTTCAGGTTTCTATAAATGTATATGATCCATAATAAAGCCTCGTCCGACATGAAGGAA
TAAGCAATAAAAAATATTGAGGCTCCGTTTGCCTGTATATATCGGATTAGTCAACCGTAATTTACGTCCTGACAAATGTGTGTTACTGATGAAAAGGC
TGTTATTGATCTGATGTGATGGCTAAGAAAAGACCTGTAATGATTTGGACTATTAGGACAGACTCCTAGAAGGGACCCAAAGTTTCATCATG
ATGAAATGTTGGATGGGCGAGGTAGTCAATGAATGAGTGGTTAATAATTTAAATAATGGGTGTGTTTTCTGATGTTTGTCT

>PP_5_CONS_Homo sapiens

CTCCTAGGAGGTGAGGATGAGTGAATGTTAATGTCATTAAGGAGAGAAGGAAGAGAAGTAAAGCCGAGGGCGTCTTTGATTGTGTAGTAAGGGTGGGA
AGGTGATTTTATCGGAATGGGAGGTGATTCTAGGGGTTGTTTATCCGTTTCTGCAAGAATAGGAGGTGGAGTGTGCTAGGGCTGCAATAAT
GAAGGGTAAGATGAAGTGAAGGTAAAGAATCGTGTGAGGGTGGGACTGTCTACTGAGTAGCCTCCTCAGATTCACTGAAGTGTGCTGCTCCCAATG
TATGGGATGGCGGATAGTAAGTTTGAATTAATGTTGCTGCCCCCTCAGAATGATATTTGGCCTCACGGGAGGACATAGCCTATGAAGGCTGTGCTATAGT
TGCAAGCAGGAGGATAATGCCGATGTTTCAGGTTTCTGAGTAGAGAAATGATCCGTAATATAGGCCTCGTCCGATGTGTAGGAAGAGGACAGATAAA
GAATATTGAGGCGCCATTGGCGTGAAGGTAGCGGATGATTACGCCATAATTTACGTCCTGAGTGTGTTGGGCGATTGATGAAAAGGCGGTTGAGGC
GTCTGGTGAGTAGTGCATGGCTAGGAATAGTCTGTGGTGATTTGGAGGATCAGGCAGGCGCAAGGAGTGAAGCCGAAGTTTCATCATGCGGAGAT
GTTGGATGGGTTGGGAGGTGATGAATGAGTGGTTAATGATTTTATAGGGGTTAATTTTGCCTATTGGGTCATTGGTGTCTGTAGTTGAA
ATACAACGAT

>PP_6_Sus scrofa

GACCAACATCCGAAATCACACCCACTAATAAAAATTATCAACAACGCATTTCATTGACCTCCCAGCCCCCTCAAACATCTCATCATGATGAAACTTCGGT
TCCCTCTTAGGCATCTGCCTAATCTTCAAATCCTAACAGGCCTGTTCTTAGCAATACATTACACATCAGACACAACAACAGCTTCTCATCAGTTACAC
ACATTTGTGAGACGTAATACGGATGAGTTATTCGCTATCTACATGCAAACGGAGCATCCATATTTCTTTATTTGCTATTTCATCCAGTAGGCCGAG
GTCTACTACGGATCCTATATATCTAGAAACATGAAACATTGGAGTAGTCTACTATTTACCCTTATAGCAACAGCCTTCATAGGCTACGTCCTGCC
CTGAGGACAAATATCATTCTGAGGAGCTACGGTCATCACAATCTACTATCAGCTATCCCTTATATCGGAAACAGACCTCGTAGAATGAATCTGAGGGG
GCTTTTCCGTCGACAAAGCAACCTCACACGATTCTTCGCTTCCACTTTATCTGCCATTCATCATTACCCTCCTGAGCAGGCTACATCTCTATTCTG
CAGAAAACCGGATCCAAACAACCTACCAGAAATCTCATCAGACATAGACAAAATTCATTTCCACCCATACTACACTATTAAGACATTTAGGAGCCTTA
TTATAATACTAATCTACTAATCTTGTACTATTCTCACCAGACCTACTAGGAGAC

>PP_7_CONS_Gallus gallus

TCTAAACAACGAACAATAACCTTCGACCACTCTCCAAACCCCTATTCTGACTTCTAGTAGCCAACCTTCTTATCCTAACCTGAATCGGAAGCCAACCAG
TAGAACACCCCTTCATCATCATTGGCCAAATAGCATCCCTCTTACTTCACCATCCTACTTATCCTCTTCCCACAATCGGAACACTAGAAAAAAAATA
CTCAACTATAAAATCTCTAATAGTTTATGAAAAACATTGGTCTTGTAACCAAAAGATGAAGACCA

>PP_8_CONS_Amazona ochrocephala

CTGTGACAAAATCCCGTTCACCCCTACTTCTCCTTAAAAGACCTACTAGGATTCATAATCATACTCCTCTACTCTCCACCCTGCCTATTCTCCCCA
ACCTACTAGGAGACCTGAAAACCTTACCCCGGCAAACCCCTAGTAACCCCCACACATTAACCAGAATGATACTTCTATTTCGCATATGCAATCCT
ACGCTCAATCCCAACAACTAGGAGGTGTCTAGCCCTAGCTGCCTCCGTAATACTCTGATCCTAAGCCCTTCTCCACAAATCCAAAACACGAAC
CATAGCCTTCGCCCCATCTCCAACTCCTATTCTGAGCCTTAGCCGCAACCTGTTTCATCTTAACATGAGTGGGGAGCCAACCAGTAGAGCACCCGTT
CATTACTATTGGGCAACTGGCCTCATTAGCCTACTTCTATCATCCTAGTCTAATCCCTATCACCTCCTCCTAGAAAAAAAATCCTAACTAAACTC
TAGTAGTTTACAATAAACATTGGTCTTGTAACC

>PP_9_CONS_Cairina moschata

TGGTTTACAAGACCAATGTTTTTATAAACTATTAGAGTATTTAGTAGTTAAGCATTTTTTTTTCTAGGGCGCTTACGGCGGAAAGAGAAATAGGATG
ATGGTGAAGTAGGTGATTGATGCAAGTTGGCCGATGATGATGAACGGGTGTTCAACGGGTGGCTCCTACTCATGTTAGGACGAGGAGGTTGGCC
ACTAGTGCTCAGAATAGGAGCTGAGAGAGTGGCCGGAATGTCATTGTTCTGTTTACTTGTGAAGGAAGGGGACTAAGAATAGGATCAGTACA
GAGGGCGCTAGTGCTAGGACCCCTAGTTTGTTCGGGATTGAGCGTAGGATGGCGTAAGCAATAGGAAATATCATTCTGGCTTGATGTGTGGTG
GGGTCACTAGCGGTTTCGCTGGGGTGAAGTTTTCTGGTCCCTAGGAGTTTGGTGAGAATAGGGCTAATGCTATCAGGGGGGTGAGTATAAGAA
TAAACCCTAGGACATCTTTGAAGGAAAA

>PP_10_CONS_Meleagris gallopavo

AAATCCCATTCCACCCCTACTACTATCAAAGACATCCTAGGTCTAACAATCATACTAACCCCTTACTCACATTAACCCCTATTCTCACCTAACCTCTTA
GGAGACCCAGAAAACCTTACCCAGCAAATCCACTAGTAACCCCCACACATTAACCAGAGTGATACTTTCTATTTGCCTACGCAATCCTACGCTCA
ATCCAAACAACTTGGAGGTGTCTAGCCTTAGCAGCATCAGTACTATTCTTCTCCTTATCCCCTTCTCATAAATCTAAACAACGGGCAATAACAT
TCCGGCCACTCTCACAACTTATTCTGACTCTTAGTAGCAAACCTCCTCATCCTAACCTGAGTAGGAAGCCAACCAGTAGAACACCCATTATCATCAT
TGGCCAAATAGCATCCCTTCTACTTCACTATCTTAATCCTCTTCCCCTAATCGGAGCCCTAGAAAAAAAATACTCAACCTCTAAGTACTCTAAT
AGTTTATGAAAAACATTGGTCTTGTAACCAAA

>PP_11_CONS_Aratinga erythrogenys

TTGGTTTACAAGACCAATGTTTTTGTAACTATTAGAGTTTAGTTGAGGATTTTGTCTCTAGGGAGGAGATGGTGGGGAGTAGGATTAGGATGATG
GTGAAGTAGGTTAATGAAGCTAGTTGTCCGATGATGATGAAGGGGTGCTCTACTGGTTGGCTTCCAATTCATGTTAAAATAAATAGGTTGGCGGCTA
GCGTTTCAAGATAGGAGTTGGGATATGGGGCGGAAGGTTATAGCTCGTTGTTAGATTTGTGTAGCAGGGGGCTTAGGAATAGGATTAGTACGGAGG
CAGCTAAGGCTAAGACGCCTCTAATTTGTTGGGATTGAGCGTAGAATTGCATATGCGAAGAGGAAGTATCATTCTGGTTTGTGTGGGGGGGT
TACTAAGGGGTTTGTGGGGTGAAGTTTTCGGGATCTCCTAATAGGTTGGGGAGAATAGGGCAAGGGTGGTAAGTAGGAATAATAGGATTGTAA
GCCTAGTAGGTTTATAGGGAGAAATAGGGGTGCAAAGG

>PP_12_CONS_Aratinga mitrata

TTTGGTTTACAAGACCAATGTTTTTGTAACTATTAGAGTTTAGTTGAGGATTTTGTCTCTAGGGAGGAGATGGTGGGGAGTAGGATTAGGATGAT
GGTGAAGTAGGTTAATGAAGCTAGTTGTCCGATGATGATGAAGGGGTGCTCTACTGGTTGGCTTCCAATTCATGTTAAAATAAATAGGTTGGCGGCT
AGCGTTTCAAGATAGGAGTTGGGATATGGGGCGGAAGGTTATAGCTCGTTGTTAGATTTGTGTAGCAGGGGGCTTAGGAATAGGATTAGTACGGAG
GCAGCTAAGGCTAAGACGCCTCTAATTTGTTGGGATTGAGCGTAGAATTGCATATGCGAAGAGGAAGTATCATTCTGGTTTGTGTGGGGGGG
TTACTAAGGGGTTTGTGGGGTGAAGTTTTCGGGTCTCCTAATASGTTGGGGGAGAATAGGGCAAGGGTGGTAAGTAGGAATAA

>PP_13_CONS_Graydidasculus brachyurus

GATTTCTAACCATATTTCTCCTACTCTCACCCCTCGCCCTGTTCTCCCCAAGCTACTGGGAGACCCCGAAAATTTACCCCAAGCAATCCTCTAGTAACT
CCCCCCACATCAAACCTGAGTGGTACTTCTGTCATACGCTATTCTACGCTCAAT

IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbasi I, Cunio R, Warburg A. Identification of blood meals imbibed by phlebotomine sand flies using cytochrome b PCR and reverse line blotting. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2009 Feb; 9(1):79-86.
- Acha P, Szyfres B. Zoonosis and communicable diseases common to man and animals. 1987. 2a ed. Washington, DC: Pan American Health Organization. Scientific Publication 503.
- Aguilar PV, Greene IP, Coffey LL, Medina G, Moncayo AC, Anishchenko M, *et al.* Endemic Venezuelan equine encephalitis in northern Peru. *Emerg Infect Dis.* 2004 May; 10(5):880-8.
- Aguilar PV, Barrett AD, Saeed MF, Watts DM, Russell K, Guevara C, *et al.* Iquitos virus: a novel reassortant Orthobunyavirus associated with human illness in Peru. *PLoS Negl Trop Dis.* 2011 Sep; 5(9): e1315
- Aitken T, Downs W, Anderson C, Spence L, Casals J. Mayaro virus isolated from a Trinidadian mosquito, *Mansonia venezuelensis*. *Science.* 1960 Apr1; 131(3405):986.
- Aitken T. Habits of some mosquito hosts of VEE (Mucambo) virus from northeastern South America, including Trinidad. In: Proceedings of workshop-symposium on Venezuelan encephalitis virus. Washington: Pan American Health Organization; Scientific Publ 1972 (243): 254–6.
- Anderson JF, Andreadis TG, Vossbrinck CR, Tirrell S, Wakem EM, French RA, *et al.* Isolation of West Nile virus from mosquitoes, crows, and a Cooper's hawk in Connecticut. *Science* 1999 Dec 17; 286(5448):2331-3
- Andreadis TG, Anderson JF, Vossbrinck CR. Mosquito surveillance for West Nile virus in Connecticut, 2000: isolation from *Culex pipiens*, *Cx. restuans*, *Cx. salinarius*, and *Culiseta melanura*. *Emerg Infect Dis.* 2001 Jul-Aug;7(4):670-4.
- Ansell J, Hu JT, Gilbert SC, Hamilton KA, Hill AV, Lindsay SW, Improved method for distinguishing the human source of mosquito blood meals between close family members. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2000; 94: 572–574.
- Barrera R, Ferro C, Navarro JC, Freier J, Liria J, Salas R, *et al.* Contrasting sylvatic foci of Venezuelan equine encephalitis virus in northern South America. *Am J Trop Med Hyg.* 2002 Sep;67(3):324-34.
- Bataille M, Crainic K, Leterreux M, Durigon M, deMazancourt P, 1999. Multiplex amplification of mitochondrial DNA for human and speclanciies identification in forensic evaluation. *Forensic Sci Int* 99: 165–170.
- Boreham PF. Some applications of bloodmeal identifications in relation to the epidemiology of vector-borne tropical diseases. *J Trop Med Hyg.* 1975Apr; 78(4):83-91.
- Brault AC, Powers AM, Ortiz D, Estrada-Franco JG, Navarro-Lopez R, Weaver SC. Venezuelan equine encephalitis emergence: enhanced vector infection from a single amino acid substitution in the envelope glycoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004 Aug 3; 101(31):11344-9.
- Bres, P. Impact of arboviruses on human and animal health. In: Monath TP, eds. *The Arboviruses: Epidemiology and Ecology*, Vol. 1. Florida CRC Press; 1988: 2–18.

- Burke D, Monath T, Flaviviruses. Knipe D, Howley P, eds .Fields Virology. Fourth edition. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins, 2001, 043–1126.
- Carrara AS, Gonzales G, Ferro C, Tamayo M, Aronson J, Paessler S, *et al.* Venezuelan equine encephalitis virus infection of spiny rats. *Emerg Infect Dis.* 2005 May; 11(5):663-9.
- Causey AR, Causey CE, Maroja OM, Macedo. The isolation of arthropod-borne viruses, including members of two hitherto undescribed serological groups, in the Amazon region of Brazil. *Am J Trop Med Hyg.* 1961 Mar; 10:227-49.
- Centers for Disease Control and Prevention. Updated guidelines for evaluating public health surveillance systems. *Morbidity and Mortality Weekly Report*, 2001, 50/RR-13.
- Chirgwin JM, Przybyla AE, MacDonald RJ, Rutter WJ. Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochemistry.* 1979 Nov 27; 18(24):5294-9.
- Chow E, Wirtz RA, Scott TW. Identification of blood meals in *Aedes aegypti* by antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay. *J Am Mosq Control Assoc.* 1993 Jun; 9(2):196-205.
- Chow-Shaffer E, Sina B, Hawley WA, De Benedictis J, Scott TW. Laboratory and field evaluation of polymerase chain reaction-based forensic DNA profiling for use in identification of human blood meal sources of *Aedes aegypti* (Diptera:Culicidae). *J Med Entomol.* 2000 Jul; 37(4):492-502.
- Cicero C, Johnson NK. Higher-level phylogeny of new world vireos (aves:vireonidae) based on sequences of multiple mitochondrial DNA genes. *MolPhylogenet Evol.* 2001 Jul; 20(1):27-40.
- Ciota AT, Bialosuknia SM, Zink SD, Brecher M, Ehrbar DJ, Morrissette MN, *et al.* Effects of Zika Virus Strain and *Aedes* Mosquito Species on Vector Competence. *Emerg Infect Dis.* 2017 Jul; 23(7):1110-1117.
- Colan, Dengue epidemic Perú. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.*1990; 991: 40145-7
- Consoli, Rotrait. Principais mosquitos de importancia sanitaria no Brasil. Rio de Janeiro Fiocruz 1994
- Crans WJ. The status of *Aedes sollicitans* as an epidemic vector of eastern equine encephalitis in New Jersey. *Mosq News.* 1977; 37: 85–89.
- Cupp EW, Zhang D, Yue X, Cupp MS, Guyer C, Sprenger TR, *et al.* Identification of reptilian and amphibian blood meals from mosquitoes in an eastern equine encephalomyelitis virus focus in central Alabama. *Am J Trop Med Hyg.* 2004 Sep; 71(3):272-6.
- Da Silva MNF. Four New Species of Spiny Rats of the Genus *Proechimys* (Rodentia: Echimyidae) From the Western Amazon of Brasil. *Proceedings of the Biological Society of Washington, Washington.* 1998; 111(2): 436-471.
- de Thoisy B, Gardon J, Salas RA, Morvan J, Kazanji M. Mayaro virus in wild mammals, French Guiana. *Emerg Infect Dis.* 2003 Oct;9(10):1326-9. Erratum in: *Emerg Infect Dis.* 2003 Dec;9(12):1659.
- deBenedictis J, Chow-Shaffer E, Costero A, Clark GA, Edman JD, Scott TW. Identification of the people from whom engorged *Aedes aegypti* took blood meals in Florida,

- Pureto Rico, using polymerase chain reaction-based DNA profiling. *Am J Trop Med Hyg.* 2003; 68: 4437–4446.
- Dégallier N, Travassos da Rosa A, Silva J, Rodrigues S, Vasconcelos P, Travassos da Rosa J As aves como hospedeiras de arbovírus na Amazônia brasileira. *Boletim Museu Paraense Emílio Goeldi* 1992; 8, 69–111.
- dos Santos Silva J, Alencar J, Costa JM, Seixas-Lorosa E, Guimarães AÉ. Feeding patterns of mosquitoes (Diptera: Culicidae) in six Brazilian environmental preservation areas. *J Vector Ecol.* 2012 Dec; 37(2):342-50.
- Felsenstein J. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution.* 1985 Jul; 39(4):783-791.
- Fernández Z, Richartz R, Travassos da Rosa A, Soccol VT. Identificação do vírus causador da encefalomielite eqüina, Paraná, Brasil. *Rev Saude Pública.* 2000; 34:232-5.
- Ferro C, Boshell J, Moncayo AC, Gonzalez M, Ahumada ML, Kang W, *et al.* Natural enzootic vectors of Venezuelan equine encephalitis virus, Magdalena Valley, Colombia. *Emerg Infect Dis.* 2003 Jan; 9(1):49-54.
- Figueiredo L, Calvacante S, Simoes M. Dengue serologic survey of school children in Rio de Janeiro, Brazil in 1986 and 1987. *Bull Pan Am Health Organ.* 1990; 24:217-25.
- Fischer M, Staples JE; Arboviral Diseases Branch, National Center for Emerging and Zoonotic Infectious Diseases, CDC. Notes from the field: chikungunya virus spreads in the Americas - Caribbean and South America, 2013-2014. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2014 Jun 6; 63(22):500-1.
- Forattini OP, Gomes AC, Natal D, Katitani I, Marucci D. Preferências alimentares de mosquitos Culicidae no Vale da Ribeira, São Paulo, Brasil. *Rev.Saúde Pública.* 1987; 21: 171-187.
- Francki RIB, Fauquet CM, Knudson DL, Brown L.eds. Classification and Nomenclature of Viruses; Fifth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. *Arch Viro(suppl.2).* Vienna: Springer-Verlag 1991.
- Galindo P, Grayson MA. *Culex (Melanoconion) aikenii*: natural vector in Panama of endemic Venezuelan encephalitis. *Science.* 1971 May 7; 172(3983):594-5.
- Galindo P. Endemic vectors of Venezuelan encephalitis. In: Proceedings of workshop-symposium on Venezuelan encephalitis virus,. Washington: Pan American Health Organization; Scientific Publ. 1972; p. 249–53.
- Gomez B, Sanchez E, Feliciangeli MD. Man-vector contact of phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) in north-central Venezuela as assessed by blood meal identification using dot-ELISA. *J Am Mosq Control Assoc.* 1998 Mar; 14(1):28-32.
- Gubler, D. Dengue and dengue hemorrhagic fever. *Clin Microbiol Rev.* 1988; 11: 480-496
- Gubler, D. *Aedes aegypti* and *Aedes aegypti*-borne disease control in the 1990s : top down or bottom up. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1989; 40:571–578.
- Guzmán M, Kouri G, Bravo J, Soler M, Vásquez S, Santos M. Dengue haemorrhagic fever in Cuba. II. Clinical investigations. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1984; 78:239-419.
- Hamer GL, Kitron UD, Brawn JD, Loss SR, Ruiz MO, Goldberg TL, Walker ED. *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae): a bridge vector of West Nile virus to humans. *J Med Entomol.* 2008 Jan; 45(1):125-8.

- Harbach R. The Culicidae (Diptera): a review of taxonomy, classification and phylogeny. *Zootaxa*. 2007; 1668: 591–638.
- Hassan HK, Cupp EW, Hill GE, Katholi CR, Klingler K, Unnasch TR. Avian host preference by vectors of eastern equine encephalomyelitis virus. *Am J Trop Med Hyg*. 2003 Dec;69(6):641-7.
- Haydon DT, Cleaveland S, Taylor LH, Laurenson MK. Identifying reservoirs of infection: a conceptual and practical challenge. *Emerg Infect Dis*. 2002 Dec; 8(12):1468-73.
- Hennessey M, Fischer M, Staples JE. Zika Virus Spreads to New Areas – Region of the Americas, May 2015-January 2016. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2016 Jan 29;65(3):55-8.
- Herrera-Basto E, Prevots DR, Zarate ML, Silva JL, Sepulveda-Amor J. First reported outbreak of classical dengue fever at 1,700 meters above sea level in Guerrero State, Mexico, June 1988. *Am J Trop Med Hyg*. 1992 Jun;46(6):649-53.
- Hurk AF van den, Ritchie SA, Mackenzie JS: Ecology and geographical expansion of Japanese encephalitis. *Ann Rev Entomol*. 2009; 54:17-35
- Irby, W.S. & Apperson, C.S. Hosts of mosquitoes in the coastal plain of North Carolina. *Journal of Medical Entomology*. 1988; 25: 85-93.
- Johansen CA, van den Hurk AF, Ritchie SA, Zborowski P, Nisbet DJ, Paru R, Bockarie MJ, *et al*. Isolation of Japanese encephalitis virus from mosquitoes (Diptera: Culicidae) collected in the Western Province of Papua New Guinea, 1997-1998. *Am J Trop Med Hyg*. 2000 May; 62(5):631-8.
- Jones JW, Turell MJ, Sardelis MR, Watts DM, Coleman RE, Fernandez R, *et al*. Seasonal distribution, biology, and human attraction patterns of culicine mosquitoes (Diptera: Culicidae) in a forest near Puerto Almendras, Iquitos, Peru. *J Med Entomol*. 2004 May; 41(3):349-60.
- Karabatsos N, ed. *International Catalog of Arboviruses including Certain Other Viruses of Vertebrates*, 3d ed. San Antonio: American Society for Tropical Medicine; 1985.
- Kent RJ, Norris DE. Identification of mammalian blood meals in mosquitoes by a multiplexed polymerase chain reaction targeting cytochrome B. *Am J Trop Med Hyg*. 2005 Aug; 73(2):336-42.
- Kent RJ. Molecular methods for arthropod bloodmeal identification and applications to ecological and vector-borne disease studies. *Mol Ecol Resour*. 2009 Jan; 9(1):4-18.
- Kilpatrick AM, Daszak P, Jones MJ, Marra PP, Kramer LD. Host heterogeneity dominates West Nile virus transmission. *Proc Biol Sci*. 2006 Sep 22;273(1599):2327-33.
- Klein TA, Lima JB, Tang AT. Seasonal distribution and diel biting patterns of culicine mosquitoes in Costa Marques, Rondônia, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1992 Jan-Mar; 87(1):141-8.
- Kramer, L. D. & Scherer, W. F. Vector competence of mosquitoes as a marker to distinguish Central American and Mexican epizootic from enzootic strains of Venezuelan encephalitis virus. *Am. J. Trop. Med. Hyg*. 1976 Mar; 25 (2):336–346.
- Kuno G, Chang GJ, Tsuchiya KR, Karabatsos N, Cropp CB. Phylogeny of the genus *Flavivirus*. *J Virol*. 1998 Jan; 72(1):73-83.

- Kwok S, Kellogg DE, McKinney N, Spasic D, Goda L, Levenson C, *et al.* Effects of primer-template mismatches on the polymerase chain reaction: human immunodeficiency virus type 1 model studies. *Nucleic Acids Res.* 1990 Feb 25; 18(4):999-1005.
- Lanciotti RS, Roehrig JT, Deubel V, Smith J, Parker M, Steele K, *et al.* Origin of the West Nile virus responsible for an outbreak of encephalitis in the northeastern United States. *Science.* 1999 Dec 17; 286(5448):2333-7.
- Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, *et al.* Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics.* 2007 Nov 1;23(21):2947-8.
- Lee JH, Hassan H, Hill G, Cupp EW, Higazi TB, Mitchell CJ, *et al.* Identification of mosquito avian-derived blood meals by polymerase chain reaction-heteroduplex analysis. *Am J Trop Med Hyg.* 2002 May; 66(5):599-604.
- Lillibridge KM, Parsons R, Randle Y, Travassos da Rosa AP, Guzman H, Siirin M, *et al.* The 2002 introduction of West Nile virus into Harris County, Texas, an area historically endemic for St. Louis encephalitis. *Am J Trop Med Hyg.* 2004 Jun;70(6):676-81.
- Lord CC, Woolhouse ME, Heesterbeek JA, Mellor PS. Vector-borne diseases and the basic reproduction number: a case study of African horse sickness. *Med Vet Entomol.* 1996 Jan; 10(1):19-28.
- Lourenço-de-Oliveira R, Failloux AB. High risk for chikungunya virus to initiate an enzootic sylvatic cycle in the tropical Americas. *PLoS Negl Trop Dis.* 2017 Jun 29;11(6)
- Mackey K, Steinkamp A, Chomczynski P. DNA Extraction from Small Blood Volumes and Single-Tube DNA Extraction and Amplification Using Blood Filter Cards. *Molecular Biotechnology.* 1998; 9: 1-5.
- Manual de procedimientos de seguridad, Safety Operacional Procedures (SOP), del Centro de Investigaciones NMRCDC Lima - Perú, área de arbovirus. 2009.
- Martínez-de la Puente J, Ruiz S, Soriguer R, Figuerola J. Effect of blood meal digestion and DNA extraction protocol on the success of blood meal source determination in the malaria vector *Anopheles atroparvus*. *Malar J.* 2013 Mar 21; 12:109.
- McCabe ER, Huang SZ, Seltzer WK, Law ML. DNA microextraction from dried blood spots on filter paper blotters: potential applications to newborn screening. *Hum Genet.* 1987 Mar; 75(3):213-6.
- Meece JK, Reynolds CE, Stockwell PJ, Jenson TA, Christensen JE, Reed KD. Identification of mosquito bloodmeal source by terminal restriction fragment length polymorphism profile analysis of the cytochrome B gene. *J Med Entomol.* 2005 Jul;42(4):657-67.
- Molaei G, Andreadis TG. Identification of avian- and mammalian-derived bloodmeals in *Aedes vexans* and *Culiseta melanura* (Diptera: Culicidae) and its implication for West Nile virus transmission in Connecticut, U.S.A. *J Med Entomol.* 2006 Sep; 43(5):1088-93.
- Molaei G, Oliver J, Andreadis TG, Armstrong PM, Howard JJ. Molecular identification of blood-meal sources in *Culiseta melanura* and *Culiseta morsitans* from an endemic focus of eastern equine encephalitis virus in New York. *Am J Trop Med Hyg.* 2006 Dec; 75(6):1140-7.
- Molaei G, Andreadis TG, Armstrong PM, Bueno R Jr, Dennett JA, Real SV, Sargent C, *et al.* Host feeding pattern of *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) and its role

- in transmission of West Nile virus in Harris County, Texas. *Am J Trop Med Hyg.* 2007 Jul; 77(1):73-81.
- Molaei G, Andreadis TG, Armstrong PM, Diuk-Wasser M. Host-feeding patterns of potential mosquito vectors in Connecticut, U.S.A.: molecular analysis of bloodmeals from 23 species of *Aedes*, *Anopheles*, *Culex*, *Coquillettidia*, *Psorophora*, and *Uranotaenia*. *J Med Entomol.* 2008 Nov; 45(6):1143-51.
- Monath TP. *Arboviruses: Epidemiology and Ecology*. Florida: CRC Press; 1988; 5:153-190
- Monath TP. *Flaviviruses*. In Fields BN, Knipe DM, Chanock RM. *Virology*, 2nd ed. New York: Raven Press; 1990; 169:763-814
- Mukabana WR, Takken W, Seda P, Killeen GF, Hawley WA, Knols BG. Extent of digestion affects the success of amplifying human DNA from blood meals of *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae). *Bull Entomol Res.* 2002 Jun; 92(3):233-9.
- Ngo, KA, Kramer, LD. Identification of mosquito bloodmeals using polymerase chain reaction (PCR) with order-specific primers. *J Med Entomol* 2003; 40:215–222.
- Niebylski ML, Savage HM, Nasci RS, Craig GB Jr. Blood hosts of *Aedes albopictus* in the United States. *J Am Mosq Control Assoc.* 1994 Sep; 10(3):447-50.
- Nylander J. Mr Modeltest 2.3. Program distributed by the author. Evolutionary Biology Centre, Uppsala University. 2004.
- O'Guinn ML, Lee JS, Kondig JP, Fernandez R, Carbajal F. Field detection of eastern equine encephalitis virus in the Amazon Basin region of Peru using reverse transcription-polymerase chain reaction adapted for field identification of arthropod-borne pathogens. *Am J Trop Med Hyg.* 2004 Feb; 70(2):164-71.
- Ogusuku, E, Perez, JE, Paz, L, Nieto, E, et al. Identification of bloodmeal sources of *Lutzomyia* spp. in Peru. *Ann Trop Med Parasitol* 1994; 88:329–335.
- Pacheco V, Cadenillas R, Salas E, Tello C, Zeballos H. Diversidad y endemismo de los mamíferos del Perú. *Rev. Perú. Biol.* 2009; 16:005–032.
- Parson W, Parsons TJ, Scheithauer R, Holland MM. Population data for 101 Austrian Caucasian mitochondrial DNA d-loop sequences: application of mtDNA sequence analysis to a forensic case. *Int J Legal Med.* 1998; 111(3):124-32.
- Parson W, Pegoraro K, Niederstätter H, Föger M, Steinlechner M. Species identification by means of the cytochrome b gene. *Int J Legal Med.* 2000; 114(1-2):23-8.
- Paterson HE, McIntosh BM. Further studies on the chikungunya outbreak in southern Rhodesia in 1962. ii. Transmission experiments with the *Aedes furcifer-taylori* group of mosquitoes and with a member of the *anopheles gambiae* complex. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 1964 Mar; 58:52-5.
- Patton J, Da Silva M, Malcolm R. Mammals of the Rio Jurua and the evolutionary and ecological diversification of Amazonia. *Bull. Am. Mus. Nat. Hist.* 2000; 244:1–306.
- Pauvolid-Corrêa A, Tavares FN, Alencar J, Silva Jdos S, Murta M, Serra-Freire NM, *et al.* Preliminary investigation of Culicidae species in South Pantanal, Brazil and their potential importance in arbovirus transmission. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2010 Jan-Feb; 52(1):17-24.
- Pfeffer M, Proebster B, Kinney RM, Kaaden OR. Genus-specific detection of alphaviruses by a semi-nested reverse transcription-polymerase chain reaction. *Am J Trop Med Hyg.* 1997 Dec; 57(6):709-18.

- Pinheiro FP, Pinheiro M, Bensabath G, Causey OR, Shope RE. Epidemia de vírus Oropouche em Belém. *Revista do Serviço Especial de Saúde Pública*. 1962; 12:15–23.
- Posada D. & K. Crandall. Modeltest: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics*. 1998; 14(9): 817-818.
- Ravel S, Monteny N, Velasco Olmos D, Escalante Verdugo J, Cuny G. A preliminary study of the population genetics of *Aedes aegypti* (Diptera:Culicidae) from Mexico using microsatellite and AFLP markers. *Acta Trop*. 2001 Mar 30;78(3):241-50.
- Reuben R, Thenmozhi V, Samuel PP, Gajanana A, Mani TR. Mosquito blood feeding patterns as a factor in the epidemiology of Japanese encephalitis in southern India. *Am J Trop Med Hyg*. 1992 Jun; 46(6):654-63.
- Richards SL, Ponnusamy L, Unnasch TR, Hassan HK, Apperson CS. Host-feeding patterns of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in relation to availability of human and domestic animals in suburban landscapes of central North Carolina. *J Med Entomol*. 2006 May; 43(3):543-51.
- Rudnick A. Studies of the ecology of dengue in Malaysia: a preliminary report. *J Med Entomol*. 1965 Jun; 2(2):203-8.
- Savage HM, Niebylski ML, Smith GC, Mitchell CJ, Craig GB Jr. Host-feeding patterns of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) at a temperate North American site. *J Med Entomol*. 1993 Jan; 30(1):27-34.
- Schirtzinger EE, Tavares ES, Gonzales LA, Eberhard JR, Miyaki CY, Sanchez JJ, *et al*. Multiple independent origins of mitochondrial control region duplications in the order Psittaciformes. *Mol Phylogenet Evol*. 2012 Aug; 64(2):342-56.
- Sella, M. *Lotta Antimalarica a Fiumicino* (Roma): Seconda Relazione, Parte II (ed. by B. Grassi). Ministero dell'Interno, Rome .1920
- Seymour C. Sloths as hosts of arboviruses. In: Montgomery GG (Edit). *The Evolution and Ecology of Armadillos, Sloths and Vermilinguas*. Smithsonian Institution Press, Washington and London 1985; 269-278.
- Shope RE, Causey OR, De Andrade A. The Venezuelan equine encephalomyelitis complex of group A arthropod-borne viruses, including Mucambo and Pixuna from the Amazon region of Brazil. *Am J Trop Med Hyg*. 1964 Sep; 13:723-7.
- Smith LM, Burgoyne LA. Collecting, archiving and processing DNA from wildlife samples using FTA databasing paper. *BMC Ecol*. 2004 Apr 8; 4:4.
- Solomon T, Ni H, Beasley DW, Ekkelenkamp M, Cardosa MJ, Barrett AD. Origin and evolution of Japanese encephalitis virus in Southeast Asia. *J Virol*. 2003 Mar; 77(5):3091-8.
- Sorenson MD, Ast JC, Dimcheff DE, Yuri T, Mindell DP. Primers for a PCR-based approach to mitochondrial genome sequencing in birds and other vertebrates. *Mol Phylogenet Evol*. 1999 Jul; 12(2):105-14.
- Strode GK, Bugher JC, Kerr JA. *Yellow fever*. New York: McGraw-Hill; 1951
- Sullivan MF, Gould DJ, Maneesai S. Observations on the host range and feeding preferences of *Aedes albopictus* (Skuse). *J Med Entomol*. 1971 Dec 30;8(6):713-6.
- Swofford, D.L. PAUP*. *Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods)*. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts. 2002.

- Tadei WP. O gênero *Mansonia* (Diptera: Culicidae) e a proliferação de mosquitos na usina hidrelétrica de Tucuruí. In: Magalhães SB, Brito RC, Castro ER, organizadores. Energia na Amazônia. Belém: MPEG/FPA/UNAMAZ; 1996. v. 1, p. 311-8.
- Tan R, Nalim S, Suwasono H, Jennings G. B. Japanese encephalitis virus isolated from seven species of mosquitoes collected at Semarang Regency, Central Java. *Bul. Penelit. Kesehatan*. 1993; 21: 1–5.
- Tempelis CH, Hayes RO, Hess AD, Reeves WC. Blood-feeding habits of four species of mosquito found in Hawaii. *Am J Trop Med Hyg*. 1970 Mar; 19(2):335-41.
- Tempelis CH, Galindo P. Host-feeding patterns of *Culex* (Melanoconion) and *Culex* (*Aedinus*) mosquitoes collected in Panama. *J Med Entomol*. 1975 Jun 30;12(2):205-9.
- Tesh RB. A method for the isolation and identification of dengue viruses, using mosquito cell cultures. *Am J Trop Med Hyg*. 1979 Nov; 28(6):1053-9.
- Tesh RB. Arthritides caused by mosquito-borne viruses. *Annu Rev Med*. 1982; 33:31-40.
- Thiemann TC, Wheeler SS, Barker CM, Reisen WK. Mosquito host selection varies seasonally with host availability and mosquito density. *PLoS Negl Trop Dis*. 2011 Dec; 5(12):e1452.
- Travassos da Rosa AP, Turell MJ, Watts DM, Powers AM, Vasconcelos PF, Jones JW, *et al*. Trocara virus: a newly recognized Alphavirus (Togaviridae) isolated from mosquitoes in the Amazon Basin. *Am J Trop Med Hyg*. 2001 Jan-Feb; 64(1-2):93-7.
- Tsetsarkin KA, Vanlandingham DL, McGee CE, Higgs S. A single mutation in chikungunya virus affects vector specificity and epidemic potential. *PLoS Pathog*. 2007 Dec;3(12):e201.
- Turell MJ, Jones JW, Sardelis MR, Dohm DJ, Coleman RE, Watts DM, *et al*. Vector competence of Peruvian mosquitoes (Diptera: Culicidae) for epizootic and enzootic strains of Venezuelan equine encephalomyelitis virus. *J Med Entomol*. 2000 Nov; 37(6):835-9.
- Turell MJ, O'Guinn ML, Jones JW, Sardelis MR, Dohm DJ, Watts DM, *et al*. Isolation of viruses from mosquitoes (Diptera: Culicidae) collected in the Amazon Basin region of Peru. *J Med Entomol*. 2005 Sep; 42(5):891-8.
- Turell MJ, Dohm DJ, Fernandez R, Calampa C, O'Guinn ML. Vector competence of Peruvian mosquitoes (Diptera: Culicidae) for a subtype IIIC virus in the Venezuelan equine encephalomyelitis complex isolated from mosquitoes captured in Peru. *J Am Mosq Control Assoc*. 2006 Mar; 22(1):70-5.
- Turell MJ, Sardelis MR, Jones JW, Watts DM, Fernandez R, Carbajal F, *et al*. Seasonal distribution, biology, and human attraction patterns of mosquitoes (Diptera: Culicidae) in a rural village and adjacent forested site near Iquitos, Peru. *J Med Entomol*. 2008 Nov; 45(6):1165-72.
- Tuten HC, Bridges WC, Paul KS, Adler PH: Blood-feeding ecology of mosquitoes in zoos. *Med Vet Entomol*. 2012; 26:407–416.
- Unnasch RS, Sprenger T, Katholic CR, Cupp EW, Hill GE, TR. A dynamic transmission model of eastern equine encephalitis virus. *Ecological Modeling*. 2006; 192: 425–440

- Vasconcelos HB, Nunes MR, Casseb LM, Carvalho VL, Pinto da Silva EV, Silva M, *et al.* Molecular epidemiology of Oropouche virus, Brazil. *Emerg Infect Dis.* 2011 May;17(5):800-6.
- Vaughan JA, Noden BH, Beier JC, Concentrations of human erythrocytes by anopheline mosquitos (Diptera: Culicidae) during feeding. *J Med Entomol.* 1991; 28: 780–786.
- Vega-Rúa A, Zouache K, Girod R, Failloux AB, Lourenço-de-Oliveira R. High level of vector competence of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* from ten American countries as a crucial factor in the spread of Chikungunya virus. *J Virol.* 2014 Jun; 88(11):6294-306.
- Vilcarromero S, Aguilar PV, Halsey ES, Laguna-Torres VA, Razuri H, Perez J, *et al.* Venezuelan equine encephalitis and 2 human deaths, Peru. *Emerg Infect Dis.* 2010 Mar; 16(3):553-6.
- Vilcarromero S, Laguna-Torres VA, Fernández C, Gotuzzo E, Suárez L, Céspedes M, *et al.* Venezuelan equine encephalitis and upper gastrointestinal bleeding in child. *Emerg Infect Dis.* 2009 Feb; 15(2):323-5.
- Walder R, Suarez OM, Calisher CH. Arbovirus studies in the Guajira region of Venezuela: activities of eastern equine encephalitis and Venezuelan equine encephalitis viruses during an interepizootic period. *Am J Trop Med Hyg.* 1984 Jul; 33(4):699-707.
- Watts DM, Callahan J, Rossi C, Oberste MS, Roehrig JT, Wooster MT, *et al.* Venezuelan equine encephalitis febrile cases among humans in the Peruvian Amazon River region. *Am J Trop Med Hyg.* 1998 Jan; 58(1):35-40.
- Watts DM, Lavera V, Callahan J, Rossi C, Oberste MS, Roehrig JT, *et al.* Venezuelan equine encephalitis and Oropouche virus infections among Peruvian army troops in the Amazon region of Peru. *Am J Trop Med Hyg.* 1997a Jun;56(6):661-7.
- Watts DM, Phillips I, Callahan JD, Griebenow W, Hyams KC, Hayes CG. Oropouche virus transmission in the Amazon River basin of Peru. *Am J Trop Med Hyg.* 1997b Feb;56(2):148-52.
- Weaver SC, Salas R, Rico-Hesse R, Ludwig GV, Oberste MS, Boshell J, *et al.* Re-emergence of epidemic Venezuelan equine encephalomyelitis in South America. VEE Study Group. *Lancet.* 1996 Aug 17; 348(9025):436-40.
- Weaver SC, Reisen WK. Present and future arboviral threats. *Antiviral Res.* 2010 Feb; 85(2):328-45.
- White DJ, Kramer LD, Backenson PB, Lukacik G, Johnson G, Oliver JA, *et al.* Arbovirus Research Laboratory; Statewide West Nile Virus Response Teams. Mosquito surveillance and polymerase chain reaction detection of West Nile virus, New York State. *Emerg Infect Dis.* 2001 Jul-Aug; 7(4):643-9.

Identification of Blood Meals from Potential Arbovirus Mosquito Vectors in the Peruvian Amazon Basin

Pedro M. Palermo,^{1*} Patricia V. Aguilar,^{2,3} Juan F. Sanchez,⁴ Víctor Zorrilla,⁵ Carmen Flores-Mendoza,⁵ Anibal Huayanay,⁵ Carolina Guevara,⁵ Andrés G. Lescano,⁶ and Eric S. Halsey⁷

¹Department of Biological Sciences, Border Biomedical Research Center, University of Texas at El Paso, El Paso, Texas; ²Institute for Human Infections and Immunity, Galveston, Texas; ³Department of Pathology, University of Texas Medical Branch, Galveston, Texas; ⁴Department of International Health, Johns Hopkins Bloomberg School of Public Health, Baltimore, Maryland; ⁵U.S. Naval Medical Research Unit No. 6, Lima, Peru; ⁶Universidad Peruana Cayetano Heredia, Lima, Peru; ⁷Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, Georgia

Abstract. The transmission dynamics of many arboviruses in the Amazon Basin region have not been fully elucidated, including the vectors and natural reservoir hosts. Identification of blood meal sources in field-caught mosquitoes could yield information for identifying potential arbovirus vertebrate hosts. We identified blood meal sources in 131 mosquitoes collected from areas endemic for arboviruses in the Peruvian Department of Loreto by sequencing polymerase chain reaction amplicons of the *cytochrome b* gene. *Psorophora (Janthinosoma) albigena*, *Psorophora (Grabhamia) cingulata*, *Mansonia humeralis*, *Anopheles oswaldoi* s.l., and *Anopheles benarrochi* s.l. had mainly anthropophilic feeding preferences; *Aedes (Ochlerotatus) serratus*, and *Aedes (Ochlerotatus) fulvus* had feeding preferences for peridomestic animals; and *Culex (Melanoconion)* spp. fed on a variety of vertebrates, mainly rodents (spiny rats), birds, and amphibians. On the basis of these feeding preferences, many mosquitoes could be considered as potential enzootic and bridge arbovirus vectors in the Amazon Basin of Peru.

Arboviruses are viruses transmitted by arthropods and constitute an important source of human disease,¹ especially in tropical and subtropical areas. The Amazon Basin of Peru has a wide variety of habitats for arthropods and hosts, providing an environment conducive for arbovirus transmission. Several arboviruses, including dengue virus, St. Louis encephalitis virus, Ilheus virus, Venezuelan equine encephalitis virus (VEEV), Mayaro virus (MAYV), Oropouche virus (OROV), Guaroa virus, and group C viruses, are endemic to the Peruvian Amazon Basin and have been associated with human disease.^{2,3}

Field and laboratory studies have implicated some mosquito species as vectors of arboviruses in the Peruvian Amazon Basin, including *Culex (Melanoconion)* spp. and *Psorophora* spp.^{4,5} However, the transmission cycle and vertebrate hosts of many endemic arboviruses are poorly understood.^{6,7} This information is critical because understanding the vertebrate hosts involved in the transmission of arboviruses could help in the design and implementation of control strategies against arbovirus outbreaks. The purpose of this initial study was to use molecular techniques to identify blood meals in putative arbovirus vectors in an enzootic area of the Amazon Basin of Peru.

An entomological survey was carried out from January to March 2009 (rainy season), as part of a health assessment study in two villages in the Province Datem del Marañón (Saramiriza, Puerto America), located along the Marañón River, and two villages in the Province Alto Amazonas (Lagunas, Santa Cruz), located near the Huallaga River. This area consists of small rural communities with high rates of emerging and reemerging infectious diseases⁸ (Figure 1).

Mosquitoes were collected using three different methods. Centers for Disease Control and Prevention (CDC) light traps (one trap/day) were set at 3 m above forest ground and more than 100 m from houses; these functioned over a

12-hour interval (6 PM–6 AM) over a period of 2–5 days/site. In addition, human landing catchers (one trap/day), who exposed their legs and aspirated mosquitoes as they landed, collected mosquitoes in peridomestic areas during the early evening (6 PM–9 PM) over a period of 2–4 days/site. Lastly, collections inside houses using backpack aspirators were performed (20 minutes per house) during daylight (8 AM–12:45 PM) over a period of 2–14 days/site. A total of four to nine night traps were set in each site. Backpack aspirations and human landing catcher collections were not performed on same dates as CDC light traps. The use of humans for collecting mosquitoes was approved by the Naval Medical Research Center Institutional Review Board in compliance with all applicable Federal regulations governing the protection of human subjects (protocol no. 2009.0002).

Captured mosquitoes were identified to species using dichotomous keys.⁹ Female blood-engorged mosquitoes were placed individually and stored at –80°C. Mosquito abdomens were used for blood meal analysis (Supplemental Information). Also, to identify arboviruses from mosquito vectors with coincident host identification of blood meals, mosquito heads and thoraxes were tested on cell culture (C6/36 and Vero 76 cells), and by immunofluorescence assay.³ In addition, RNA was extracted from the mosquito homogenate using the QIAamp viral RNA kit (Qiagen, Valencia, CA), and generic reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) was performed to detect nucleic acid from alpha-viruses or flaviviruses.^{10,11}

A total of 22,513 mosquitoes were collected during the study, belonging to 11 genera and 37 species (V. Zorrilla and others, unpublished data). The largest number of specimens (16,947 [75.3%] mosquitoes, 35 [94.6%] species) were collected with CDC light traps, followed by human landing catchers (3,888 [17.3%] mosquitoes, 22 [59.5%] species), and backpack aspirators (1,678 [7.4%] mosquitoes, 18 [48.6%] species).

One hundred and forty-six identified mosquitoes (0.6% of total) had evidence of blood in the abdomen and were tested for blood meal identification. Of them, 41, 10, and 95 mosquitoes were captured in a forest, domestic, and

*Address correspondence to Pedro M. Palermo, Department of Biological Science and Border Biomedical Research Center, University of Texas at El Paso, 500 West University Avenue, El Paso, TX 79968. E-mail: ppalermo@utep.edu



FIGURE 1. Map of Peru showing locations of mosquito collections in the Department of Loreto, Peru. (A) Saramiriza, Puerto America, and Nuevo Jerusalen. (B) Lagunas.

peridomestic setting, respectively. Specimens belonged to five of 11 (45.4%) genera and 12 of 37 (32.4%) different species: *Psorophora (Janthinosoma) albigena* (Peryassu), *Psorophora (Grabhamia) cingulata* (Fabricius), *Aedes (Ochlerotatus) serratus* (Theobald), *Aedes (Ochlerotatus) fulvus* (Wiedemann), *Mansonia humeralis* Dyar and Knab, *Anopheles benarrochi* s.l. Gabaldon, Cova Garcia and Lopez, *Anopheles oswaldoi* s.l. (Peryassu), *Culex (Melanoconion) occosa* Dyar and Knab, *Culex (Melanoconion) dunnii* Dyar, *Culex (Melanoconion) portesi* Senevet and Abonnenc, *Culex (Melanoconion) vomerifer* Komp, *Culex (Aedinus) amazonensis* (Lutz), and *Culex (Melanoconion) spp.* Of 146 samples assayed, blood meal sources were identified by DNA sequencing in 131 (89.7%) (Tables 1 and 2).

In the Province Datem del Marañon sites (Table 1), *Ps. albigena* preferentially fed on humans ($N = 64$; $97.0\% \pm 4.2\%$), with one mosquito also feeding on dogs. *Aedes* spp. mainly fed on humans only, but a few *Ae. serratus* fed on dogs and pigs, and some *Ae. fulvus* fed on cows. The blood meal sources for the single *Cx. vomerifer* and *Cx. (Aedinus) amazonensis* captured were *Proechimys cuvieri* and *Proechimys breviceauda* spiny rats, respectively (Figure 2). The only source of blood of the single *Cx. portesi* specimen was a cat, whereas other *Culex (Mel.)* spp. fed on mammals and birds. Of the three *An. benarrochi* s.l., two fed on dogs and one on a pig. Humans were the only source of blood for *Ma. humeralis*, *Ps. cingulata*, and *An. oswaldoi* s.l., although only 3–5 specimens of each species were tested.

Only 11 specimens were tested from the Province of Alto Amazonas. Single specimens of *Ps. albigena* and *Ae. serratus* fed on birds, whereas *Cx. vomerifer* and *Cx. occosa* fed on humans and spiny rats (*Proechimys quadriplacatus*).

TABLE 1
Vertebrate blood meal sources identified in mosquitoes collected in sites located in the Province of Datem del Marañon, Loreto, 2009

| Host (% Nt identity) | <i>Psorophora (Janthinosoma) albigena</i> | | <i>Psorophora (Grabhamia) cingulata</i> | | <i>Aedes (Ochlerotatus) serratus</i> | | <i>Aedes (Ochlerotatus) fulvus</i> | | <i>Mansonia humeralis</i> | | <i>Anopheles benarrochi</i> s.l. | | <i>Anopheles oswaldoi</i> s.l. | | <i>Culex (Melanoconion) portesi</i> | | <i>Culex (Melanoconion) vomerifer</i> | | <i>Culex (Aedinus) amazonensis</i> | | <i>Culex (Melanoconion) spp.</i> | | | |
|---|---|---------|---|---------|--------------------------------------|---------|------------------------------------|---------|---------------------------|---------|----------------------------------|---------|--------------------------------|---------|-------------------------------------|---------|---------------------------------------|---------|------------------------------------|---------|----------------------------------|---------|--|--|
| | No. (%) | No. (%) | No. (%) | No. (%) | No. (%) | No. (%) | No. (%) | No. (%) | No. (%) | No. (%) | No. (%) | No. (%) | No. (%) | No. (%) | No. (%) | No. (%) | No. (%) | No. (%) | No. (%) | No. (%) | No. (%) | No. (%) | | |
| Mammal | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <i>Homo sapiens</i> "human" (98%) | 64 (97) | 3 (100) | 16 (88) | 6 (75) | 4 (100) | 2 (67) | 5 (100) | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <i>Sus scrofa</i> "pig" (99%) | | | 1 (6) | | | 1 (33) | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <i>Bos taurus</i> "cow" (99%) | 1 (1) | | | 2 (25) | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <i>Canis lupus</i> "dog" (98%) | 1 (1) | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <i>Felis catus</i> "cat" (98%) | | | 1 (6) | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <i>Dasyprocta fuliginosa</i> "agouti" (99%) | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <i>Proechimys cuvieri</i> "spiny rat" (99%) | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <i>Proechimys breviceauda</i> "spiny rat" (99%) | 1 (1) | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Bird | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <i>Butorides viriscens</i> "green heron" (97%) | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Total mosquitoes | 66 | 3 | 18 | 8 | 4 | 3 | 5 | | | | | | | | | | | | | | | | | |

NI = nucleotide.
*Species with mixed blood meals.

TABLE 2
Vertebrate blood meal sources identified in mosquitoes collected in sites in the Province of Alto Amazonas, Loreto, 2009

| Host (% Nt identity) | <i>Psorophora</i> (<i>Janthinosoma</i>) <i>albigena</i> | <i>Aedes</i> (<i>Ochlerotatus</i>) <i>serratus</i> | * <i>Culex</i> (<i>Melanoconion</i>) <i>dunni</i> | <i>Culex</i> (<i>Melanoconion</i>) <i>ocossa</i> | <i>Culex</i> (<i>Melanoconion</i>) <i>vomerifer</i> | <i>Culex</i> (<i>Melanoconion</i>) spp. |
|--|---|--|---|--|---|---|
| | No. (%) | No. (%) | No. (%) | No. (%) | No. (%) | No. (%) |
| Mammal | | | | | | |
| <i>Homo sapiens</i> "human" (98–99%) | | | 1 (100) | 1 (100) | | 1 (17) |
| <i>Dasyprocta fuliginosa</i> "black agouti" (99%) | | | | | | 1 (17) |
| <i>Choloepus didactylus</i> (92%)†‡ "sloth" | | | 1 (100) | | | |
| <i>Proechimys quadriplicatus</i> "spiny rat" (99%) | | | | | 1 (100) | |
| Bird | | | | | | |
| <i>Crypturellus undulatus</i> (91%)† "undulated tinamou" | | | | | | 1 (17) |
| <i>Sclateria naevia</i> "silvered antbird" (98%) | | | | | | 1 (17) |
| <i>Ixobrychus sinensis</i> (91%)† "yellow biter"† | | | | | | 1 (16) |
| <i>Crotophaga ani</i> "smooth-billed ani" (98%) | 1 (100) | | | | | |
| <i>Gallinula chloropus</i> (91%)† "common moorhen"† | | 1 (100) | | | | |
| Amphibian | | | | | | |
| <i>Bufo</i> spp. "true toads" (99%) | | | | | | 1 (16) |
| Total mosquitoes | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 6 |

Nt = nucleotide.
*Species with mixed blood meals.
†Identity percentage (91–92%) in the GenBank database.

Culex (Mel.) spp. had a variety of blood meal sources from mammals, birds, and amphibians (Table 2). In addition, for one *Cx. dunni*, the sources of blood were from both a human and two-toed sloth (*Choloepus didactylus*). Cell culture and PCR failed to detect an arbovirus in any of the 146 mosquitoes.

This is the first study in the Peruvian Amazon Basin identifying blood meal sources from mosquitoes, like *Culex*

(*Mel.*) spp., *Ps. albigena*, *Ae. serratus*, and *Ae. fulvus*, all thought to be involved in the enzootic and epizootic cycle of arboviruses. *Psorophora albigena* had mostly anthropophilic feeding preferences, which is consistent with studies conducted in Brazil¹² and in Peru using human landing catchers.¹³ In addition, in a few specimens, we found DNA from multiple vertebrates (including a mosquito with two

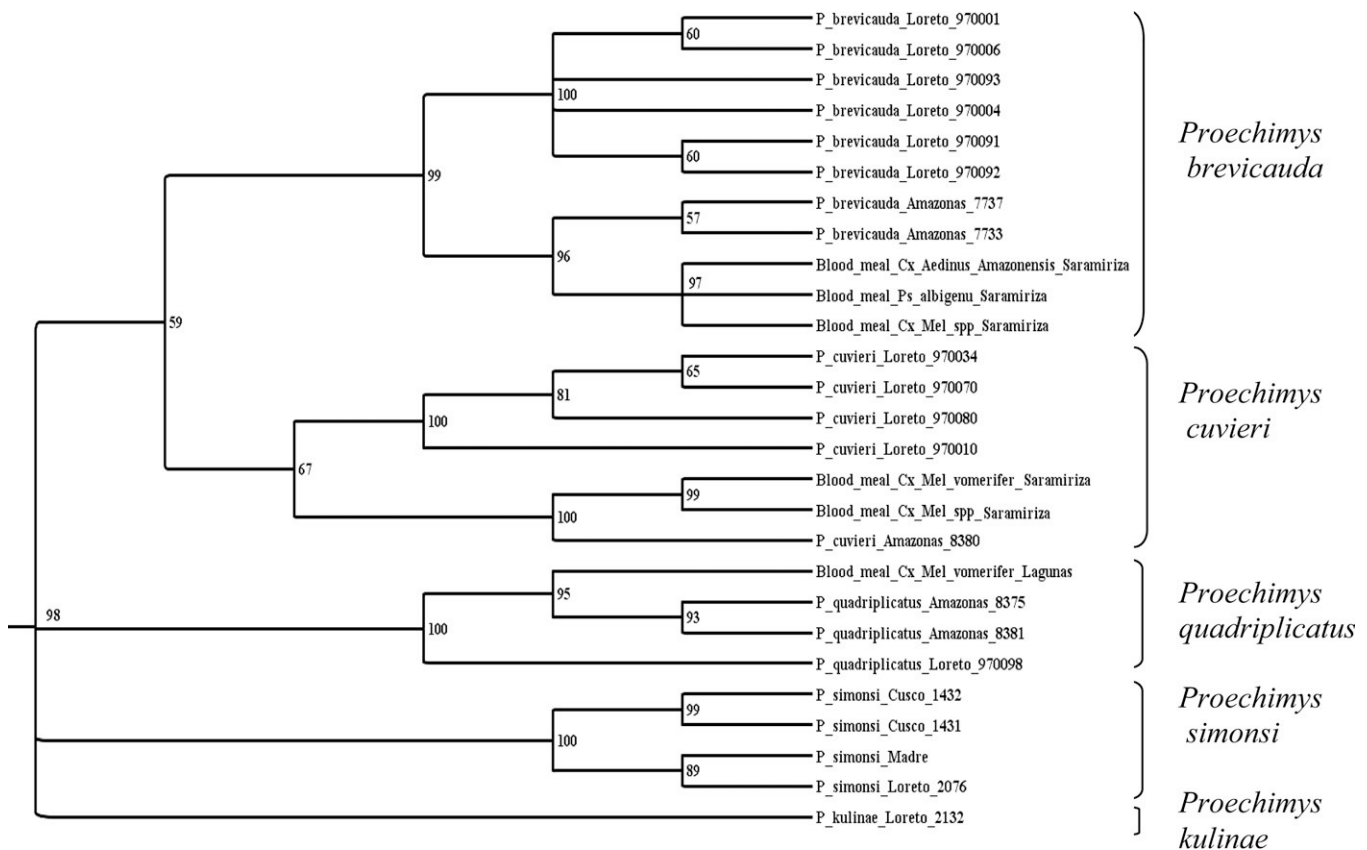


FIGURE 2. Maximum parsimony cladogram for the first 690 base pairs of the *cytochrome b* gene of Peruvian spiny rats *Proechimys*. Numbers at specific nodes are bootstrap values (1,000 replicates) above 50%. Sequences of *Echymis* and *Isothrix* were used as outgroups.

different blood meals) such as spiny rats, cows, dogs, and smooth-billed anis, the latter a suspected host of OROV and MAYV in Brazil.¹⁴ Eclectic feeding behavior of *Ps. albigenu* has been reported in forest-protected areas of Brazil,^{15,16} suggesting *Ps. albigenu* feeding preference was based on host availability. Our data suggests that *Ps. albigenu* could be a bridge vector in the transmission of alphaviruses between animals and humans. This observation is supported by the fact that *Ps. albigenu* is susceptible to VEEV and eastern equine encephalitis virus (EEEV) infection and is able to transmit these viruses.^{4,5,7}

Aedes serratus and *Ae. fulvus* had anthropophilic and peridomestic feeding preferences in our study, findings consistent with previous reports from Brazil.^{9,16} In the Amazon Basin, *Ae. serratus* and *Ae. fulvus* have yielded isolates of alphaviruses such as Trocara virus, Una virus, and EEEV.⁷ Even though *Ae. fulvus* has been shown to be susceptible to VEEV and EEEV infection, its competence to transmit those alphaviruses was very limited.^{4,5} Nevertheless, transmission studies with other alphaviruses circulating in the Amazon Basin are needed to evaluate the vector competence of *Aedes* (*Och.*) spp.

Culex vomerifer fed on spiny rats, including *P. quadriplicatus* and *P. cuvieri*. Phylogenetic analysis, using the *cyt b* sequences obtained from mosquito blood meals in this study and compared with the *cyt b* *Proechimys* database, identified separate species clades with monophyletic support (Figure 2). Spiny rats (Family Echimyidae) are considered to be enzootic hosts of VEEV that develop little or no disease after infection.¹⁷ Our data demonstrated that *Culex* (*Mel.*) spp. fed on *Proechimys* spp. In addition, cases of VEEV subtype ID have been reported in Yurimaguas, a nearby location, suggesting possible enzootic VEEV (ID) transmission involving *Culex* (*Mel.*) spp. and *Proechimys* spp.¹⁸ *Culex dunni*, which has been implicated as a vector of VEEV and EEEV,⁷ had blood meals of both sloth and human origin. *Culex portesi* and *Cx. occosa* had a peridomestic behavior also observed in studies from Brazil.¹² Both mosquito species have been identified as enzootic vectors for VEEV in Trinidad and Panamá.¹⁹

A limitation of our study was that morphological characterization alone prevented definitive species identification of some *Culex* (*Mel.*) spp. Sequences of internal transcribed spacer 2 (ITS2) of ribosomal DNA have been useful for solving taxonomy and phylogenetic relationships in *Culex* (*Mel.*) spp. mosquitoes.²⁰ Generation of an ITS2 sequence database from local mosquito specimens could improve the ability to properly identify mosquitoes in the Peruvian Amazon Basin. Also, the wide variety of blood meal sources, many with low GenBank identity (Table 2), in *Culex* (*Mel.*) spp. from Lagunas may be partially attributable to an absence of local host *cyt b* sequences in the database. Another limitation was that none of the mosquitoes tested yielded an arbovirus, which is not surprising due to the low infectivity rate normally found in field-collected mosquitoes.

In summary, our study has provided additional insight on the host-feeding patterns of some potential arboviral vectors in the Peruvian Amazon Basin. Our observations are consistent with previously reported data for *Culex* (*Mel.*) spp.^{4,5} and, taken together, the feeding preference of this mosquito species supports a possible role in the enzootic cycle of alphavirus transmission in the Peruvian Amazon Basin. Severe and fatal VEEV (ID) cases have been reported in

Lagunas and others localities in the Province of Alto Amazonas,²¹ emphasizing the need for better clarification of its transmission dynamics. Future studies could evaluate the seroprevalence of VEEV (ID) and other arboviruses causing human disease in local animal populations and assess the susceptibility of these animals (e.g., spiny rats) to infection with these viruses.

Received March 3, 2016. Accepted for publication July 11, 2016.

Published online September 12, 2016.

Note: Supplemental information appears at www.ajtmh.org.

Acknowledgments: We thank J. Patton for providing access to the *cytochrome b* database and D. Watts for his critical review of the manuscript.

Financial support: This work was funded by the U.S. Southern Command (SOUTHCOM) and Armed Forces Health Surveillance Center–Global Emerging Infections Surveillance (GEIS) protocol NMRCD.2009.0002, Work Unit 847705 82000 25GB B0016. Andrés G. Lescano is sponsored by the training grant 2D43 TW007393 awarded by the Fogarty International Center of the U.S. National Institutes of Health.

Disclaimer: The views expressed in this article are those of the authors and do not necessarily reflect the official policy or position of the Department of the Navy, Department of Defense, or the U.S. Government. Some authors are employees of the U.S. Government (Eric S. Halsey, Víctor Zorrilla, Carmen Flores-Mendoza, and Carolina Guevara). This work was prepared as part of their official duties. Title 17 U.S.C. §105 provides that “Copyright protection under this title is not available for any work of the U.S. Government.” Title 17 U.S.C. §101 defines a U.S. Government work as a work prepared by a military service member or employee of the U.S. Government as part of that person’s official duties.

Authors’ addresses: Pedro M. Palermo, Department of Biological Sciences, Border Biomedical Research Center, University of Texas at El Paso, El Paso, TX, E-mail: ppalermo@utep.edu. Patricia V. Aguilar, Department of Pathology, University of Texas Medical Branch, Galveston, TX, E-mail: pvaguila@utmb.edu. Juan F. Sanchez, Department of International Health, Johns Hopkins Bloomberg School of Public Health, Baltimore, MD, E-mail: juan.f.sanchez@jhu.edu. Víctor Zorrilla, Carmen Flores-Mendoza, Anibal Huayanay, and Carolina Guevara, U.S. Naval Medical Research Unit No. 6, Washington, DC, E-mails: victor.zorrilla@med.navy.mil, carmen.flores@med.navy.mil, anibalhuayanay@gmail.com, and carolina.guevara.fn@mail.mil. Andrés G. Lescano, Universidad Peruana Cayetano Heredia, Lima, Peru, E-mail: andres.lescano.g@upch.pe. Eric S. Halsey, Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA, E-mail: ycw8@cdc.gov.

REFERENCES

- Weaver SC, Reisen WK, 2010. Present and future arboviral threats. *Antiviral Res* 85: 328–345.
- Morrison AC, Forshey BM, Notyche D, Astete H, Lopez V, Rocha C, Carrion R, Carey C, Eza D, Montgomery JM, Kochel TJ, 2008. Venezuelan equine encephalitis virus in Iquitos, Peru: urban transmission of a sylvatic strain. *PLoS Negl Trop Dis* 2: e349.
- Forshey BM, Guevara C, Laguna-Torres VA, Cespedes M, Vargas J, Gianella A, Vallejo E, Madrid C, Aguayo N, Gotuzzo E, Suarez V, Morales AM, Beingolea L, Reyes N, Perez J, Negrete M, Rocha C, Morrison AC, Russell KL, Blair PJ, Olson JG, Kochel TJ; NMRCD Febrile Surveillance Working Group, 2010. Arboviral etiologies of acute febrile illnesses in western South America, 2000–2007. *PLoS Negl Trop Dis* 4: e787.
- Turell MJ, O’Guinn ML, Dohm D, Zyzak M, Watts D, Fernandez R, Calampa C, Klein TA, Jones JW, 2008. Susceptibility of Peruvian mosquitoes to eastern equine encephalitis virus. *J Med Entomol* 45: 720–725.

5. Turell MJ, Jones JW, Sardelis MR, Dohm DJ, Coleman RE, Watts DM, Fernandez R, Calampa C, Klein TA, 2000. Vector competence of Peruvian mosquitoes (Diptera: Culicidae) for epizootic and enzootic strains of Venezuelan equine encephalomyelitis virus. *J Med Entomol* 37: 835–839.
6. Watts DM, Callahan J, Rossi C, Oberste MS, Roehrig JT, Wooster MT, Smith JF, Cropp CB, Gentrau EM, Karabatsos N, Gubler D, Hayes CG, 1998. Venezuelan equine encephalitis febrile cases among humans in the Peruvian Amazon River region. *Am J Trop Med Hyg* 58: 35–40.
7. Turell MJ, O'Guinn ML, Jones JW, Sardelis MR, Dohm DJ, Watts DM, Fernandez R, Travassos da Rosa A, Guzman H, Tesh R, Rossi CA, Ludwig V, Mangiafico JA, Kondig J, Wasieloski LP Jr, Pecor J, Zyzak M, Schoeler G, Mores CN, Calampa C, Lee JS, Klein TA, 2005. Isolation of viruses from mosquitoes (Diptera: Culicidae) collected in the Amazon Basin region of Peru. *J Med Entomol* 42: 891–898.
8. Sanchez JF, Halsey ES, Bayer AM, Beltran M, Razuri HR, Velasquez DE, Cama VA, Graf PC, Quispe AM, Maves RC, Montgomery JM, Sanders JW, Lescano AG, 2015. Needs, acceptability, and value of humanitarian medical assistance in remote Peruvian Amazon riverine communities. *Am J Trop Med Hyg* 92: 1090–1099.
9. Consoli RA, de Oliveira RL, 1994. *Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil*. Rio de Janeiro, Brazil: Editora FIOCRUZ.
10. Pfeffer M, Proebster B, Kinney RM, Kaaden OR, 1997. Genus-specific detection of alphaviruses by a semi-nested reverse transcription-polymerase chain reaction. *Am J Trop Med Hyg* 57: 709–718.
11. Kuno G, Chang GJ, Tsuchiya KR, Karabatsos N, Cropp CB, 1998. Phylogeny of the genus *Flavivirus*. *J Virol* 72: 73–83.
12. Forattini OP, Gomes Ad C, Natal D, Kakitani I, Marucci D, 1987. Preferências alimentares de mosquitos Culicidae no Vale do Ribeira, São Paulo, Brasil. *Rev Saude Publica* 21: 171–187.
13. Jones JW, Turell MJ, Sardelis MR, Watts DM, Coleman RE, Fernandez R, Carbajal F, Pecor JE, Calampa C, Klein TA, 2004. Seasonal distribution, biology, and human attraction patterns of culicine mosquitoes (Diptera: Culicidae) in a forest near Puerto Almendras, Iquitos, Peru. *J Med Entomol* 41: 349–360.
14. Dégallier N, Travassos da Rosa A, da Silva JC, Guerreiro Rodrigues S, Vasconcelos P, Travassos da Rosa J, Pereira da Silva G, Pereira da Silva R, 1992. As aves como hospedeiras de arbovirus na amazônia brasileira. *Bol Mus Para Emílio Goeldi ser Zoo* 8: 69–111.
15. dos Santos Silva J, Alencar J, Costa JM, Seixas-Lorosa E, Guimaraes AE, 2012. Feeding patterns of mosquitoes (Diptera: Culicidae) in six Brazilian environmental preservation areas. *J Vector Ecol* 37: 342–350.
16. Mucci LF, Junior RP, de Paula MB, Scandar SA, Pacchioni ML, Fernandes A, Consales CA, 2015. Feeding habits of mosquitoes (Diptera: Culicidae) in an area of sylvatic transmission of yellow fever in the state of Sao Paulo, Brazil. *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis* 21: 6.
17. Carrara AS, Gonzales G, Ferro C, Tamayo M, Aronson J, Paessler S, Anishchenko M, Boshell J, Weaver SC, 2005. Venezuelan equine encephalitis virus infection of spiny rats. *Emerg Infect Dis* 11: 663–669.
18. Aguilar PV, Greene IP, Coffey LL, Medina G, Moncayo AC, Anishchenko M, Ludwig GV, Turell MJ, O'Guinn ML, Lee J, Tesh RB, Watts DM, Russell KL, Hice C, Yanoviak S, Morrison AC, Klein TA, Dohm DJ, Guzman H, Travassos da Rosa AP, Guevara C, Kochel T, Olson J, Cabezas C, Weaver SC, 2004. Endemic Venezuelan equine encephalitis in northern Peru. *Emerg Infect Dis* 10: 880–888.
19. Seymour C, 1985. Sloths as hosts of arboviruses. Montgomery GG, ed. *The Evolution and Ecology of Armadillos, Sloths, and Vermilinguas*. Washington, DC: Smithsonian Institution Press, 269–278.
20. Navarro JC, Weaver SC, 2004. Molecular phylogeny of the Vomerifer and Pedroi groups in the Spissipes Section of the subgenus *Culex* (*Melanoconion*). *J Med Entomol* 41: 575–581.
21. Vilcarromero S, Aguilar PV, Halsey ES, Laguna-Torres VA, Razuri H, Perez J, Valderrama Y, Gotuzzo E, Suarez L, Cespedes M, Kochel TJ, 2010. Venezuelan equine encephalitis and 2 human deaths, Peru. *Emerg Infect Dis* 16: 553–556.