

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



"Implementación de la Prueba de ELISA para la Identificación
de las Alimentaciones Sanguíneas en *Ae. albopictus*"

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRIA EN CIENCIAS
CON ESPECIALIDAD EN ENTOMOLOGIA MEDICA.

PRESENTA

QBP FRANCISCO JAVIER LOZOYA ENRIQUEZ

SAN NICOLAS DE LOS GARZA, N. L.

MARZO DEL 2004

TM
Z5320
FCB
2004
.L8

TRONZO

COMPLIACIÓN DE LA PRUEBA DE IDENTIFICACIÓN
UNIVERSARIA EN A.S. ALCOPIROS

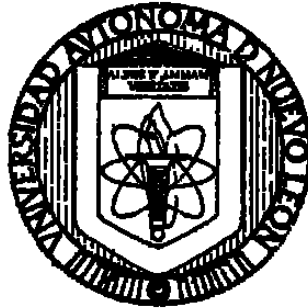
2004



1020146164

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



**"Implementación de la Prueba de ELISA para la Identificación
de las Alimentaciones Sanguíneas en *Ae. albopictus*"**

T E S I S

**PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRIA EN CIENCIAS
CON ESPECIALIDAD EN ENTOMOLOGIA MEDICA**

P R E S E N T A

QBP FRANCISCO JAVIER LOZOYA ENRIQUEZ

SAN NICOLAS DE LOS GARZA, N. L.

MARZO DEL 2004

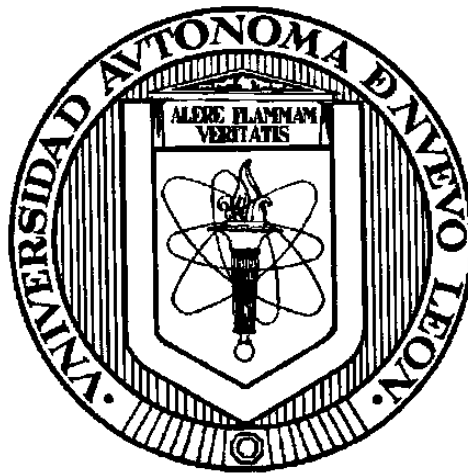
978466

TH
75320
FEB
2004
L8



FONDO
TESIS

**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**



**“Implementación de la Prueba de ELISA para la Identificación de las
Alimentaciones Sanguíneas en *Ae. albopictus*”**

TESIS

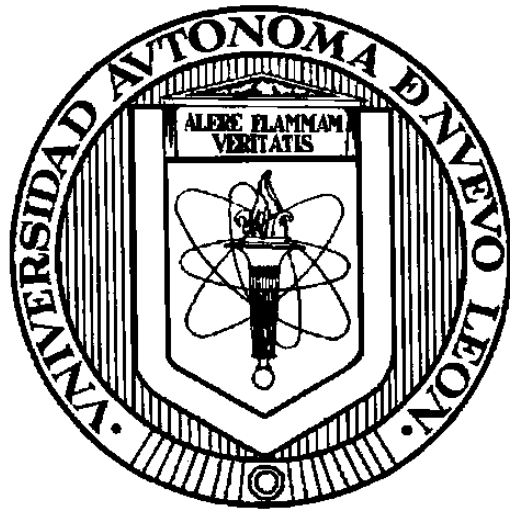
**PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS
CON ESPECIALIDAD EN ENTOMOLOGÍA MÉDICA**

PRESENTA

QBP FRANCISCO JAVIER LOZOYA ENRÍQUEZ

**SAN NICOLAS DE LOS GARZA, N.L.
MARZO DEL 2004**

**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO**



**“IMPLEMENTACIÓN DE LA PRUEBA DE ELISA PARA LA
IDENTIFICACIÓN DE LAS ALIMENTACIONES SANGUÍNEAS EN
Ae. albopictus”**

TESIS

**PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRÍA EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD
EN ENTOMOLOGÍA MÉDICA**

PRESENTA

QBP FRANCISCO JAVIER LOZOYA ENRÍQUEZ

SAN NICOLAS DE LOS GARZA, N.L.

Mayo, 2004

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO**

**“IMPLEMENTACIÓN DE LA PRUEBA DE ELISA PARA LA
IDENTIFICACIÓN DE LAS ALIMENTACIONES SANGUÍNEAS EN *Ae.
albopictus*”**

TESIS

**PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRÍA EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD
EN ENTOMOLOGÍA MEDICA**

PRESENTA

QBP FRANCISCO JAVIER LOZOYA ENRÍQUEZ

COMISION DE TESIS

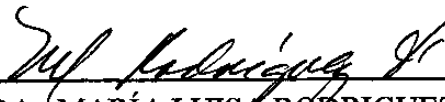


ILDEFONSO FERNÁNDEZ SALAS Ph. D.

DIRECTOR



**DRA. ADRIANA FLORES SUÁREZ
SECRETARIA**



**DRA. MARÍA LUISA RODRIGUEZ TOVAR
VOCAL**

DEDICATORIA

Esta etapa de mi vida, de superación personal y académica se dio en circunstancias muy especiales en mi trabajo docente en la Facultad de Medicina Unidad Torreón de la Universidad Autónoma de Coahuila, la cual se encontraba en una situación administrativa y política de transición, que finalmente se ha visto superada, pero que nos afectó a mi esposa, mi hijo y a mi madre por el distanciamiento implícito en este proyecto.

De manera MUY ESPECIAL, esta tesis va dedicada a mi esposa MARÍA CRISTINA CORREA DE LOZOYA y a mi hijo PABLO LOZOYA CORREA, sin quienes no hubiera sido posible superar todas las circunstancias adversas, la soledad y riesgos que se presentaron durante dos años de viajes, desvelos y otras actividades realizadas en mi estancia en la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

Mi madre, GUADALUPE ENRÍQUEZ DE LOZOYA, también merece un reconocimiento especial, porque a través de sus oraciones a Dios nuestro Señor y sus bendiciones, he podido regresar a mis actividades laborales y familiares.

A mis tíos SOLEDAD ENRIQUEZ DE LOPEZ y VICENTE LÓPEZ ESTRADA (†); primos (que más bien son mis hermanos) CLARA ARMIDA LÓPEZ DE CHAFFINO y su esposo CARLOS CHAFFINO, VICENTE DE PAUL LOPEZ ENRIQUEZ y su esposa BELEN LEY DE LOPEZ, MONICA ELIZABETH LOPEZ DE ARREOLA, SOLEDAD LOPEZ DE CARDENAS (†) y VERONICA LOPEZ ENRIQUEZ; y sobrinos KARLA MARIBEL, CARLOS LUIS y BLANCA FABIOLA CHAFFINO LOPEZ, PAUL JAVIER, DIANA y MONICA LOPEZ LEY y ADAN PAUL, EVA Y EMILIANO ARREOLA LOPEZ, porque a pesar de la distancia que nos separaba físicamente, nunca dejaron de darme ánimo para continuar y terminar mis estudios.

RECONOCIMIENTOS

A LA FACULTAD DE MEDICINA UNIDAD TORREÓN, DE MANERA ESPECIAL A LA DIRECCIÓN DE ASUNTOS ACADÉMICOS DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE COAHUILA, POR HABERME PROPORCIONADO TODAS LAS FACILIDADES PARA REALIZAR LOS ESTUDIOS DE MAESTRÍA EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN ENTOMOLOGÍA MÉDICA EN LA FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN.

AL CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA (CONACYT), POR EL APOYO ECONÓMICO EN FORMA DE BECA QUE ME CONCEDIÓ PARA LA REALIZACIÓN DE ESTE POSTGRADO.

A LA DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSTGRADO DE LA FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN (FCB-UANL) POR HABERME ACEPTADO COMO ESTUDIANTE DEL PROGRAMA DE MAESTRÍA EN ESTA ESPECIALIDAD.

AGRADECIMIENTOS

EN PRIMER LUGAR DESEO EXPRESAR MI MAYOR AGRADECIMIENTO A MI ASESOR ILDEFONSO FERNÁNDEZ SALAS Ph. D. POR SU ORIENTACIÓN, ADEMÁS DE TODAS LAS FACILIDADES OTORGADAS PARA LA REALIZACIÓN DE LA PRESENTE INVESTIGACIÓN. TAMBIÉN POR SUS CONSEJOS, AMISTAD, CONFIANZA Y TODAS LAS OPORTUNIDADES QUE ME BRINDO DURANTE MI ESTANCIA EN EL LABORATORIO DE ENTOMOLOGÍA MÉDICA DE LA FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS, UNIDAD "B" DE LA U.A.N.L.

AGRADEZCO TAMBIÉN A LAS INTEGRANTES DE LA COMISIÓN DE TESIS, LAS DRAS. ADRIANA FLORES SUÁREZ Y MARIA LUISA RODRIGUEZ TOVAR, POR SU AYUDA DURANTE MI FORMACIÓN ACADÉMICA.

AL DR. JUAN FRANCISCO CONTRERAS CORDERO POR LAS FACILIDADES PARA LA REALIZACIÓN DE LAS PRUEBAS PRELIMINARES DE LOS ENSAYOS DE ELISA EN SU LABORATORIO DE VIROLOGIA DE LA MISMA FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS, PERO EN LA UNIDAD "A", Y TAMBIÉN POR SUS ORIENTACIONES PARA LA PRESENTACIÓN DE MIS PRIMEROS SEMINARIOS.

DESEO INCLUIR TAMBIÉN EN ESTA SECCIÓN A OTRO GRAN AMIGO DE MUCHOS AÑOS Y COMPAÑERO ACADÉMICO EN OTRAS ETAPAS DE MI VIDA, EL DR. CARLOS EDUARDO HERNÁNDEZ LUNA, CON QUIEN ME VOLVI A REENCONTRAR EN MONTERREY DESPUÉS DE VARIOS AÑOS DE NO VERLO.

A MIS MAESTROS LOS DRES. ROBERTO MERCADO HERNANDEZ Y LUCIO GALABIZ, QUIENES CONTRIBUYERON EN MI FORMACIÓN Y COMPARTIMOS GRATOS MOMENTOS.

A MIS GRANDES AMIGOS, A LOS CUALES CONOCI COMO PERSONAS Y EXCELENTES COMPAÑEROS, JULIÁN GARCIA REJÓN, MARTÍN REYNA NAVA, SAÚL TORRES, EMILIO GALVAN, JUAN LUIS PEREZ GONZÁLEZ, HECTOR ORTA PESINA, MAURICIO CASAS, GUILLERMO BOND, CUAUHEMOC VILLARREAL,

ENRIQUE CARMONA NAVA (f) Y MUY ESPECIALMENTE A JORGE PASCUAL MARTINEZ MARTINEZ POR SU VALIOSA AYUDA, AMISTAD Y COMPAÑÍA EN LOS VIAJES DE COLECTA DE *Ae. albopictus* A LAS CIUDADES DE REYNOSA Y MATAMOROS TAMPS. Y EZEQUIEL MEGALLON GASTELUM.

A MI BUEN AMIGO JOSE GENARO ORDOÑEZ GONZALEZ, A QUIEN CONOCI CASI AL TERMINO DE MI ESTANCIA EN MONTERREY, PERO QUE ADEMÁS TUVE LA OPORTUNIDAD DE CONVIVIR Y TRATARLO UN POCO MAS, PORQUE COMPARTIMOS LA MISMA CASA.

POR SUPUESTO TAMBIEN INCLUYO A MIS AMIGAS Y TAMBIEN COMPAÑERAS HORTENCIA MURILLO, YOLANDA GARZA, CINIA DE GALAVIZ, CECILIA TRUJILLO Y NORMA GORROCHOTEGUI.

UN RECONOCIMIENTO Y AGRADECIMIENTO MUY ESPECIAL AL DR. AMERICO RODRIGUEZ Y ESPOSA, ASI COMO A TODA SU FAMILIA, A SUS PAPAS, DON AMERICO QUE YA NO SE ENCUENTRA ENTRE NOSOTROS, DOÑA SARITA, HERMANAS Y CUÑADOS, POR EL HOSPEDAJE QUE NOS HA BRINDADO DE MANERA DIRECTA E INDIRECTA A TODOS LOS QUE HEMOS ESTUDIADO LA MAESTRÍA EN ENTOMOLOGÍA MEDICA, PUES SU CASA ES TODA UNA TRADICIÓN Y CONTRIBUCIÓN A LA FORMACIÓN DE ENTOMOLOGOS MÉDICOS. A TODOS USTEDES MUCHAS PERO MUCHAS GRACIAS.

TOCA EL TURNO A TODOS MIS AMIGOS (AS) Y COMPAÑEROS (AS) DE TRABAJO DE LA FACULTAD DE MEDICINA POR SU APOYO DURANTE MI ESTANCIA EN SAN NICOLAS DE LOS GARZA, N.L.: LUIS BENJAMIN SERRANO GALLARDO, MARCOS URZÚA RAMÍREZ, LUZ MARÍA GALVÁN URIARTE, MARÍA FRANCISCA SANMIGUEL SALAZAR, MARÍA CONCEPCIÓN HERNANDEZ SERRANO, MARTHA PATRICIA NAVA HERNANDEZ Y MARIO RIVERA GUILLEN, QUIENES DESDE MI PARTIDA ME DESEARON LO MEJOR. GRACIAS POR SU AMISTAD Y COMPAÑERISMO.

CONTENIDO

RESÚMEN	1
I. INTRODUCCIÓN	
<i>Importancia del Dengue en México</i>	2
<i>Importancia de los vectores Aedes aegypti y Ae. albopictus</i>	2
<i>Importancia de conocer las fuentes de alimentación de los mosquitos y los métodos empleados (ELISA)</i>	3
II. IMPORTANCIA	4
III. ORIGINALIDAD Y JUSTIFICACIÓN	5
IV. OBJETIVOS	
4.1 OBJETIVO GENERAL	6
4.2 OBJETIVOS PARTICULARES	6
V. HIPÓTESIS DE TRABAJO	7
VI. ANTECEDENTES	
6.1 BIOLOGÍA DE Aedes (Stegomyia) albopictus (Skuse)	8
6.2 Ae. albopictus EN LOS ESTADOS UNIDOS DE NORTEAMÉRICA	9
6.3 Aedes albopictus EN MÉXICO	12
6.4 PRUEBAS DE LABORATORIO UTILIZADAS EN LA IDENTIFICACIÓN DE LAS ALIMENTACIONES SANGUÍNEAS EN MOSQUITOS	12
6.5 UTILIZACIÓN DE LA PRUEBA DE ELISA EN LA DETERMINACIÓN DEL ORIGEN DE LAS ALIMENTACIONES SANGUÍNEAS EN DíPTEROS DIFERENTES DE Ae. albopictus	14

6.6 ANÁLISIS DE LAS ALIMENTACIONES SANGUÍNEAS EN MOSQUITOS PARA OBSERVAR LOS PATRONES DE ALIMENTACIÓN	16
6.7 CÁLCULO DE LAS ALIMENTACIONES SANGUÍNEAS	17
6.8 DENGUE	18
VII. MATERIAL Y MÉTODOS	
7.1 MATERIAL Y EQUIPO	22
7.2 ÁREAS DE ESTUDIO	22
7.3 LUGARES DE TRABAJO	22
7.4 CRÍA DE LARVAS Y PUPAS DE <i>Ae. albopictus</i>	22
7.5 OBTENCIÓN DE ADULTOS Y REPRODUCCIÓN DE <i>Ae. albopictus</i>	22
7.6 OBTENCIÓN DE NUEVAS GENERACIONES DE <i>Ae. albopictus</i>	23
7.7 VIGILANCIA Y ALIMENTACIÓN DE LOS NUEVOS ESPECÍMENES	23
7.8 REGULACIÓN DEL MEDIO AMBIENTE DEL INSECTARIO	24
7.9 DISEÑO EXPERIMENTAL Y ANÁLISIS DE DATOS	24
7.10 CAPTURA DE MOSQUITOS DE CAMPO	25
7.11 IDENTIFICACIÓN DE LAS ALIMENTACIONES SANGUÍNEAS	25
7.12 ANÁLISIS DE DATOS	25
VIII. RESULTADOS	
8.1 EVALUACIÓN DE LA SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD DE LA PRUEBA DE ELISA-SANDWICH	28
8.2 DETERMINACIÓN DEL ORIGEN DE LAS ALIMENTACIONES SANGUÍNEAS EN <i>Aedes albopictus</i> CAPTURADOS EN ALGUNOS CRIADEROS IMPORTANTES DEL PAÍS (MATAMOROS Y REYNOSA, TAMPS.)	28
8.3 INVESTIGACIÓN DE LA CAPACIDAD DEL ENSAYO INMUNO ENZIMÁTICO PARA DISTINGUIR LAS ALIMENTACIONES CRÍPTICAS (SANGRE INGERIDA POR LAS HEMBRAS DE LOS MOSQUITOS PROCEDENTE DE DOS O MAS HOSPEDEROS)	31
8.4 HALLAZGO DEL TIEMPO POST ALIMENTACIÓN IDEAL PARA CONOCER EL ORIGEN DE LA SANGRE CONTENIDA EN LOS	

MOSQUITOS UTILIZANDO LA PRUEBA DE ELISA (CURVA ABSORBENCIA VS TIEMPO)	36
IX. CONCLUSIONES Y DISCUSION DE RESULTADOS	
9.1 EVALUACION DE LA SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD DE LA PRUEBA DE ELISA-SANDWICH	41
9.2 DETERMINACIÓN DEL ORIGEN DE LAS ALIMENTACIONES SANGUÍNEAS EN <i>Aedes albopictus</i> CAPTURADOS EN ALGUNOS CRIADEROS IMPORTANTES DEL PAÍS (MATAMOROS Y REYNOSA, TAMPS.)	42
9.3 INVESTIGACIÓN DE LA CAPACIDAD DEL ENSAYO INMUNO ENZIMÁTICO PARA DISTINGUIR LAS ALIMENTACIONES CRÍPTICAS (SANGRE INGERIDA POR LAS HEMBRAS DE LOS MOSQUITOS PROCEDENTE DE DOS O MAS HOSPEDEROS)	43
9.4 HALLAZGO DEL TIEMPO POST ALIMENTACIÓN IDEAL PARA CONOCER EL ORIGEN DE LA SANGRE CONTENIDA EN LOS MOSQUITOS UTILIZANDO LA PRUEBA DE ELISA (CURVA ABSORBENCIA VS TIEMPO)	43
X. LITERATURA CITADA	46
XI. ANEXOS (TABLAS Y FIGURAS)	52

INDICE DE TABLAS Y FIGURAS

DIAGRAMA DE LA PRUEBA DE ELISA SANDWICH	53
TABLA No. 1. Resultados de los cálculos de la Sensibilidad y Especificidad de la prueba de ELISA-Sandwich a ocho diluciones diferentes.	54
DIAGRAMA DE UNA PLACA PARA REALIZAR LAS PRUEBAS DE ELISA- SANDWICH A DIFERENTES DILUCIONES.	55
MAPA DE LA REPUBLICA MEXICANA.	56
MAPA DEL ESTADO DE TAMAULIPAS MOSTRANDO EL MUNICIPIO DE REYNOSA	57
MAPA DEL ESTADO DE TAMAULIPAS MOSTRANDO EL MUNICIPIO DE MATAMOROS	58

RESUMEN

Aedes (*Stegomyia*) *albopictus* (Skuse), también conocido como mosquito "tigre", se ha dispersado desde el condado de Harris, Texas desde 1985, a la mayor parte de las ciudades de los Estados Unidos de Norteamérica. La importancia de identificar las fuentes de ingestión de sangre en un artrópodo hematófago, sirven para determinar si es un vector potencial en el mantenimiento y la propagación de una enfermedad. Con esta información se demuestra, si se ha alimentado de un animal sospechoso de ser el reservorio, en donde existe la enfermedad, mientras que el hallazgo de otras ingestiones de sangre, pueden sugerir donde se adquiere y se mantiene el patógeno. En el presente estudio se utilizó la técnica de ELISA, como una prueba de validación de la Sensibilidad y Especificidad, utilizando como sueros controles, sangre de humanos, perros, gatos, bovinos y pollos. Los resultados encontrados fueron de 100% cuando las diluciones de la sangre son de 1:10 hasta 1:70, de aquí en adelante la Sensibilidad muestra un valor de 0%. Los valores de la Especificidad, para los mosquitos alimentados con sangre humana dieron desde 0 hasta 75%. En lo que respecta a los ensayos, para distinguir entre alimentaciones crípticas (sangre de más de dos hospederos), los resultados mostraron en tres de las hembras de *Ae. albopictus* capturadas en Matamoros, Tams. sangre de origen humano, pero también de perro. En otros dos mosquitos, se encontró sangre de bovino. Por su parte, los hallazgos en los mosquitos capturados en Reynosa, mostraron también sangre humana y de otros animales como gato y bovino. Los experimentos relacionados con el empleo de la prueba de ELISA para la determinación de las alimentaciones crípticas en *Ae. albopictus* criados en el laboratorio, fueron realizados solamente con tres combinaciones de los cinco hospederos, pero siempre se probaron contra los antisueros correspondientes y la única combinación que muestra problemas es la relacionada con la sangre de humano y de perro, porque la combinación de alimentación con sangre humana y de gato, así como la de gato con perro, dan resultados bien definidos. Por último, se hicieron pruebas para encontrar el tiempo post-alimentación ideal para realizar las pruebas de ELISA, en mosquitos alimentados o capturados en el campo, y una vez más los resultados fueron satisfactorios, porque con ayuda de una curva de calibración se observó que todavía hasta las 72 horas, se encuentran resultados al doble de los controles, que todavía se aceptan como positivos

I. INTRODUCCIÓN

Importancia del Dengue en México

El Dengue Clásico así como las diversas formas de presentación (Fiebre Hemorrágica por Dengue y Síndrome de Shock por Dengue), son un serio problema de salud en varias partes de México y de América Latina por los daños que ocasionan a la economía debidos a los elevados costos de la hospitalización, el cuidado de los pacientes y las medidas de control del vector. En 1977 el Serotipo 1 del Dengue fue introducido en América y México estuvo entre los países que se vieron afectados por este virus. Durante la década 1980-1990, se reportaron miles de casos humanos iniciándose con una cifra de 51406 afectados con el Serotipo 1, pero entre 1986 y 1986 fueron reportados adicionalmente los Serotipos 2 y 4; otros datos importantes fueron, que en 1984 se confirmaron 8 casos de Dengue Hemorrágico, en 1989 otros 4 y en 1990 solamente dos casos. Estas cifras nos indican como a partir de la introducción del dengue a nuestro país, éste se volvió endémico y a pesar de los esfuerzos para erradicarlo, prácticamente esta tarea se vuelve muy difícil y en todo caso lo único que se puede hacer es el establecimiento de medidas de control.

Importancia de los vectores *Aedes aegypti* y *Ae. Albopictus*

El principal vector del virus del dengue lo es sin duda alguna *Aedes aegypti*. Sin embargo la importancia potencial para la salud pública de *Ae. albopictus* depende de su capacidad para transmitir varios arbovirus, filarias y protozoos. Es conveniente señalar que hasta hace algunos años no se había demostrado el papel de *Ae. albopictus* en la transmisión de enfermedades de importancia para la salud pública en América (1995). Al primero se le conoce como “mosquito de la fiebre amarilla”, debido a que durante siglos, fueron responsables del serio problema de transmitir el virus de la fiebre amarilla urbana en Africa y América, mientras que *Ae. albopictus* es conocido como “mosquito tigre asiático”, por las características morfológicas que presenta y or el lugar de origen. *Ae. aegypti* tiene la particularidad de ser una especie principalmente doméstica, porque se cría en contenedores hechos por el hombre y la hembra de este mosquito se alimenta tanto de sangre humana como de animales domésticos. *Ae. albopictus* se estableció en el estado de Texas a partir de 1985 y para el año de 1986 ya se encontraba en 5 estados de Brasil. En la frontera norte de México

en los estados de Coahuila y Tamaulipas principalmente se le reporta a partir de 1992. Es un mosquito rural adaptado también a los ambientes urbanos. Oviposita y se desarrolla en contenedores naturales y artificiales en las áreas urbanas. Ataca a los humanos con más frecuencia que *Ae. aegypti*. Un dato interesante lo representa el hecho de que en la Florida se aisló el Virus de la Encefalitis Equina del Este (EEE), así como otros virus no patógenos, datos que reflejan el amplio rango de hospederos de esta especie de mosquito.

Importancia de conocer las fuentes de alimentación de los mosquitos y los métodos empleados (ELISA)

La razón más importante de conocer, cuáles son las fuentes de alimentación tanto de *Ae. aegypti* como las de *Ae. albopictus* que es el mosquito a estudiar en este proyecto, se basa en que cuando se encuentra sangre humana, aparte de la de otros animales domésticos y peridomésticos se está hablando del gran riesgo de adquisición y de la transmisibilidad de arbovirosis, además de otras infecciones por protozoarios y filarias, de las cuales *Ae. albopictus* en particular, puede ser un vector biológico importante, por mencionar solamente una es el caso del Dengue. Por otra parte, en cuanto a los métodos descritos y empleados para la identificación de estas alimentaciones sanguíneas esta el de ELISA (Enzymatic Linkage Immuno Sorbent Assay), que solamente ha sido descrito en otros géneros y especies de vectores, pero no en *Ae. albopictus*, por ser éste accesible, económico y confiable en sus resultados.

II. IMPORTANCIA

Algunos de los puntos que sostienen la realización de la **“Implementación de la Prueba de ELISA para la Identificación de las Alimentaciones Sanguíneas en *Ae. albopictus*”** es que precisamente, no existe en nuestro país, ni en la literatura científica, ningún antecedente relacionado, siendo que ésta es una técnica accesible, útil, confiable en sus resultados y de bajo costo, cuando se realiza en serie. Por otra parte, el encontrar sangre humana en esta especie de mosquitos nos hablará del riesgo de adquisición y transmisibilidad de ciertas arbovirosis y un ejemplo de ellas lo puede ser el Dengue.

III. ORIGINALIDAD Y JUSTIFICACIÓN

Hasta este momento, no existe ningún antecedente relacionado con el estudio de las alimentaciones sanguíneas en *Ae. Albopictus*, y tampoco del empleo de la prueba de ELISA, ni siquiera en *Ae. aegypti*, que es principal vector del Dengue en nuestro país. Con esta falta de información, no se está repitiendo ningún estudio previo, de ahí la Originalidad de la presente investigación. Por otra parte, *Ae. albopictus* se encuentra compartiendo nichos con *Ae. aegypti* en varias ciudades fronterizas de los estados de Coahuila y Tamaulipas, Múzquiz, Acuña, Piedras Negras, Reynosa y Matamoros), se Justifica la: Implementación de la Prueba de ELISA, para conocer que tanto contacto está teniendo este artrópodo hematófago con el hombre y de esta manera contar con una herramienta de laboratorio, que una vez estandarizada, pueda ser útil en estudios epidemiológicos

IV. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

Implementar la prueba de ELISA, utilizando *Ae. albopictus* como sistema modelo del ensayo Inmuno-Enzimático y que serán alimentados sobre 5 diferentes hospederos (humanos, perros, gatos, bovinos y pollos)

4.2 OBJETIVOS PARTICULARES

a). Evaluar la Sensibilidad y Especificidad de la prueba de ELISA-Sandwich, con *Aedes albopictus* criados en el laboratorio y alimentados con sangre de 5 hospederos diferentes (Humanos, perros, gatos, bovinos y pollos).

b). Determinar el origen de las alimentaciones sanguíneas en *Aedes albopictus* capturados en algunos criaderos importantes del país (Matamoros y Reynosa, Tamps.)

c). Investigar la capacidad del ensayo Inmuno-Enzimático, para distinguir las alimentaciones crípticas (sangre ingerida por las hembras de los mosquitos procedente de 2 ó más hospederos) y

d). Buscar por medio de una curva de calibración (Absorbencia vs. Tiempo) el tiempo post-alimentación ideal, para conocer el origen de la sangre contenida en los mosquitos, utilizando la prueba de ELISA.

V. HIPÓTESIS DE TRABAJO

Así como la prueba de ELISA ha demostrado ser una prueba de laboratorio muy útil cuando se le ha empleado en investigaciones relacionadas con las alimentaciones sanguíneas en otros vectores (anofelinos, flebótomos y moscas tsetse), se espera que al implementarse su uso y estandarización en *Ae. albopictus* su utilidad por lo menos sea comparable a la obtenida en esos sistemas.

VI. ANTECEDENTES

6.1 BIOLOGÍA DE *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Skuse)

Con relación a la biología del *Ae. albopictus*, existe un trabajo, en el que se describen los estudios realizados con la ecología y el comportamiento, sin dejar de faltar aspectos relacionados con la distribución, taxonomía, genética, hábitat, importancia médica, características de las diferentes fases de desarrollo como son el huevo y el adulto, de las interacciones competitivas con *Ae. aegypti*, resultados sobre la dinámica de poblaciones, fotoperíodo, vigilancia y control (Hawley, 1988).

En otra investigación realizada semanalmente durante un año (Abril de 1987-Marzo de 1988) en Malasia, se muestrearon poblaciones de *Ae. albopictus* y de *Toxorhynchites spp.* en recipientes de bambú, encontrándose cuentas larvales altos equivalentes a 31 y 49 larvas/semana durante los meses de lluvia (Septiembre y Octubre de 1987), contra 16 larvas/semana durante los meses Enero de 1988 (poca lluvia), asociados con una mayor población de *Toxorhynchites spp.* que en un momento dado sugiere, el control biológico ejercido por este depredador (Sulaimán y Jeffery, 1994).

Estudios relacionados con la supervivencia de los huevos de *Ae. albopictus* de dos cepas, una tropical procedente de Malasia (Sabah) y otra templada de Indianápolis (Indy) fueron realizados en comparación con el *Ae. triseriatus* (Say) (mosquito nativo de Norteamérica) en el norte de Indiana durante los inviernos de 1989-1990 y de 1990-1991. Los resultados mostraron una supervivencia de *Ae. albopictus* templado, pero solo en un porcentaje del 78% y eso hasta el segundo invierno. La nieve y otros materiales aislantes pueden tener un posible efecto en la supervivencia de los huevos del díptero durante el invierno (Hanson y Craig, 1995).

En relación con estudios sobre la ecología larvaria de *Ae. albopictus* en México, existe solamente una investigación realizada en las ciudades de Matamoros, Tamps., Piedras Negras y Acuña; Coah., en la que se encontraron resultados muy diferentes, pues mientras que en la primera estuvo distribuido en todo el municipio, con una marcada preferencia por los contenedores desechables (llantas, cacharros, botes y botellas), en Piedras Negras y Acuña

estuvieron localizados en cementerios y en contenedores controlables (piletas, tinas y tambos de 200 litros) (Martínez M., 1995).

6.2 *Ae. albopictus* EN LOS ESTADOS UNIDOS DE NORTEAMÉRICA

Desde que *Ae. albopictus* se introdujo e infestó los estados de Texas y Louisiana en los Estados Unidos de Norteamérica, fue visto como el hecho más singular en Entomología Médica de esta década. Por estudios realizados tanto en el Pacífico como en algunas regiones del sureste de Asia, se encontró que *Ae. albopictus* compite por los mismos nichos ecológicos peridomésticos con *Ae. aegypti*, además de ser un vector competente de algunos Serotipos del Virus del Dengue (Knudsen, 1986).

Para ese mismo año, los Centros de Control de Enfermedades (CDC) de los EUA iniciaron los estudios sobre la susceptibilidad a insecticidas y de competencia vectorial de *Ae. albopictus*, como un proceso de vigilancia de este mosquito recientemente introducido en este país (Moore, 1986).

El grupo de Reiter, planteó en su investigación, que el comercio en las llantas usadas dentro de los Estados Unidos y procedentes de Japón y de Corea, son un potencial sin precedentes en la dispersión mundial de mosquitos vectores importantes como *Ae. albopictus* y *Ae. aegypti* (Reiter y Sprenger, 1987).

El grupo de Hawley, también en 1987, publicó algunas características afines (un fotoperíodo sensible y resistencia al frío), entre las cepas de *Ae. albopictus* encontrado en algunos estados de la Unión Americana, con las que les dieron origen en las zonas templadas de Asia (Hawley y cols., 1987).

Con la finalidad de investigar cuales especies de mosquitos se estaban introduciendo en los EUA, se inspeccionaron 79 contenedores de alta mar con cargamentos equivalentes a 22051 llantas usadas procedentes de Asia, de las cuales el 25% contenían suficiente agua para mantener con vida las larvas de varias especies de mosquitos, entre las que se encontraban *Ae. albopictus*,

Ae. togoi, *Cx. pipiens*, *Tripteroides bambusa*, y *Ur. bimaculata* durante el período comprendido entre Mayo y Diciembre de 1986 (Craven y cols., 1988).

Para establecer una vigilancia de *Ae. albopictus* durante los veranos de 1986 y 1987, introducido originalmente en un cargamento de llantas en Octubre de 1986 por el puerto de Seattle, WA), varias asociaciones como el personal de la Unidad de Enfermedades Transmitidas por Vectores, así como del Departamento de Salud de Ohio y otras Agencias de Control de Mosquitos se comprometieron a realizarla. También se solicitó la colaboración del CDC así como de la División de Ecología de Arbovirus de Ft. Collins, Co. La investigación se concentró en la industria de llantas usadas obteniéndose larvas y pupas de éstas, mientras que los adultos se capturaron con aspiradores mecánicos y con trampas CDC (Berry y cols., 1988).

Hasta 1988, el “mosquito tigre” asiático, como también se le denomina al *Ae. albopictus*, no había sido incriminado con anterioridad, en la transmisión de alguna enfermedad en América, mientras que en Asia, si se le había implicado en la transmisión del Dengue Epidémico y en la transmisión de la Fiebre por Dengue Hemorrágico. Esta especie de mosquito, habita a orillas de los bosques, pero se ha adaptado rápidamente a los contenedores producidos por los humanos. A nivel experimental, es un vector competente de los virus La Crosse, Fiebre Amarilla, además de que la hembra puede transmitir 15 virus por vía transovárica. Para la época de ese estudio, ya eran 16 los estados de la Unión Americana que estaban infestados con este mosquito (Moore y cols., 1988).

Las investigaciones del grupo de Peacock plantearon documentar el descubrimiento de *Ae. albopictus* en la Florida, con la finalidad de observar las implicaciones, observaciones preliminares de vigilancia, aportaciones de control así como los obstáculos que esto provoca. El papel de este mosquito como transmisor del Virus del Dengue en condiciones ideales se mantuvo, aún cuando su actuación solamente como un chupador agresivo de humanos, es causante de molestias considerables (Peacock y cols., 1988).

Con la finalidad de llevar una vigilancia, el Departamento de Agricultura de Maryland, elaboró un programa que comprendió del 5 de Julio al 1 de Octubre de 1987, y los resultados

mostraron, que llegaban llantas procedentes de Japón y de Taiwán por el puerto de Baltimore, con la finalidad de ser conducidas a las plantas renovadoras o bien para el reciclaje del hule. Ante esta situación, los investigadores se plantearon la posibilidad de que las primeras, fueran las responsables de la mayor fuente de infestación, así como el sitio de introducción de *Ae. albopictus*, lo que motivo a que se revisaran siete negocios relacionados con estas actividades, para buscar los criaderos del mencionado mosquito. Las investigaciones revelaron dos acuerdos comerciales, los cuales procedían de regiones con poblaciones endémicas de *Ae. albopictus*, por esta situación, hubo la necesidad de emplear como control químico de las larvas de este mosquito, el Vecto Bact G en todas las llantas que las contenían en Septiembre de ese año (Sweeney y cols., 1988).

Con la finalidad de evaluar el grado de diseminación del *Ae. albopictus* dentro de las áreas residenciales, así como para documentar la selección del habitat y obtener el fondo de la información para proyectos relacionados con la eliminación de este mosquito, en 1987 se realizaron campañas de vigilancias exhaustivas en ocho ciudades de diferentes estados de los EUA. Los resultados mostraron un total de 24.4% de larvas de un total de 5728 sitios inspeccionados, habiendo un promedio de 3.27 contenedores positivos por lugar también positivo. Otro de los vectores de enfermedad que se le encontró con frecuencia en los contenedores urbanos y que es bastante conocido fue *Cx. pipiens* (Moore y cols., 1990).

Para el verano de 1992, se realizó otra campaña de vigilancia de *Ae. albopictus* en el sur de Texas, de tal manera que se encontraron 35 nuevos condados invadidos por este mosquito. Sin embargo, fue sorprendente la disminución en los condados cercanos al Río Bravo, en los cuales de manera inversa existieron altas densidades de *Ae. aegypti* (Womack, 1993).

Durante los años de 1989 y 1990, se realizaron ocho pruebas de dispersión de *Ae. albopictus* criados en el campo en un tiradero de llantas de Potosí, Mo, obteniéndose un 84.4% de recaptura en el límite del bosque entre los 10 y 600 metros del punto de liberación. Las hembras de esta especie de mosquitos sobreviven un promedio de 8.2 días, mientras que la de los machos fue de 3.9 días. Estos resultados sugieren la posible contribución en la diseminación y una amenaza potencial en la salud por este mosquito dentro de los EUA (Niebylsky y cols., 1994).

Los resultados de otra investigación realizada en 1992, mostraron como el límite de la parte sur de la Florida invadido por *Ae. albopictus* al condado Lee. Los datos obtenidos el primer año de la vigilancia mostraron la capacidad de *Ae. albopictus* para colonizar rápida y preferentemente el Suroeste rural de la Florida. Las áreas suburbanas del condado fueron las que mostraron las tasas más lentas de colonización y fue precisamente *Ae. albopictus* la especie dominante en los criaderos. Durante el período en que se realizó esa investigación, no se observó ningún desplazamiento de *Ae. aegypti* por *Ae. albopictus*. Sin embargo, a las seis semanas si hubo un desplazamiento de 8.1 Km hacia la línea divisoria sur del condado por *Ae. albopictus* (Hornby y cols., 1994).

En relación con otros estudios realizados fuera de nuestro continente, el efectuado en compañías dedicadas al recarpeteo en Veneto, Ita. fue hecho por Dalla Poza y su grupo, con la finalidad de encontrar la posible fuente de infestación por *Ae. albopictus*, en llantas usadas en Atlanta, Ga. en las cuales se encontraron huevos y larvas de este mosquito (Dalla Poza y cols., 1994).

En investigaciones relacionadas con *Ae. albopictus* en la Florida, O'Meara y su grupo reportan resultados muy parecidos a los que obtuvieron Hornby y cols. (O'Meara y cols., 1995).

6.3 *Aedes albopictus* EN MÉXICO

El primer antecedente relacionado con la introducción de *Aedes albopictus* a México se reporta en la ciudad de Matamoros, Tamps. y se atribuye a la frontera con Brownsville, Tx. como el sitio de entrada (Sprenger y Withirnyagool, 1986).

Los datos relacionados con el descubrimiento y la proliferación del mosquito "tigre" asiático en Coahuila, se hacen patentes al reportarse infestaciones, específicamente en las ciudades de Piedras Negras y Acuña, mientras que una tercera comunidad (Francisco I Madero) resulto negativo (Ibañez y Martínez Campos, 1994).

Otra investigación realizada durante el verano de 1993 en la ciudad de Múzquiz, perteneciente también al estado de Coahuila, reveló el hallazgo de larvas de *Aedes albopictus*

aunque en bajas densidades dentro de llantas y botellas. También se encontraron larvas de otros dípteros como *Ae.aegypti*, *Tx. theobaldi*, *Cx. quinquefasciatus* y *Cs. Incidens* (Rodríguez y Ortega, 1994).

6.4 PRUEBAS DE LABORATORIO UTILIZADAS EN LA IDENTIFICACIÓN DE LAS ALIMENTACIONES SANGUÍNEAS EN MOSQUITOS.

Hasta el presente, hace ya más de una década que Washino y sus colaboradores, realizaron un análisis de la metodología empleada en la identificación de la alimentaciones sanguíneas en mosquitos. Sus comentarios fueron muy favorables para la prueba de la precipitina, tanto por la sencillez, como por el mínimo de equipo que se utiliza en su realización. Con relación a la prueba de la inhibición Pasiva de la Hemaglutinación, los comentarios fueron en el sentido de que esta prueba es más compleja, pero que fue utilizada para la identificación de las alimentaciones sanguíneas por géneros y especies de mosquitos. Por aquellos años, los autores consideraron a la prueba de ELISA, sencillamente como “muy prometedora”. La técnica de la Haptoglobina por su parte, mostró el mayor potencial para el cálculo de la incidencia de las alimentaciones crípticas múltiples tomadas del hombre. Con relación a la alimentación de los mosquitos, existen en la literatura científica, varias descripciones de métodos utilizados (Washino y Tempelis, 1983).

En lo que se refiere a la prueba de ELISA, existen diversas modalidades que han sido utilizadas en diferentes tipos de mosquitos. Por ejemplo, ELISA-U, emplea a la ureasa como un marcador enzimático; Esta prueba fue utilizada específicamente, para una detección rápida de anticuerpos contra *P. falciparum*. La positividad de la prueba se basa en la producción de un intenso color púrpura. Esta técnica demostró ser efectiva, porque además no presento una reacción cruzada con sueros de pacientes con otros padecimientos infecciosos. La sensibilidad de este método, es comparable con la de anticuerpos fluorescentes, además de que se puede realizar en lapso de tiempo corto equivalente a una hora (Lee y Lambros, 1988).

Otra modificación de la prueba de ELISA, fue realizada con la finalidad de detectar los antígenos de esporozoítos de *P. falciparum* en *An.stephensi* infectados *in vitro* (la prueba es

capaz de detectar de 100-350 esporozoítos en las glándulas salivales maduras de las hembras). También se utilizaron anticuerpos monoclonales contra esporozoítos marcados con Biotina, mientras que la observación del antígeno se realizó con un complejo Peroxidasa-Estreptavidina-Biotina (Verhave y cols., 1988).

El grupo de Savage, por su parte, desarrolló un método que permite la identificación de las alimentaciones con sangre humana en mosquitos, en un plazo menor de dos horas. La base de la prueba, son tiras de papel mylar, cubiertas por unos de los lados con nitrocelulosa y que puede ser impregnado con un anticuerpo capturador antihumano, el cual, a su vez a sido bloqueado, secado y almacenado durante tres meses previos a su utilización. Esta tira reactiva, detectó alimentaciones con sangre humana en *Anopheles spp.* congelados; la técnica es altamente específica y no se detectaron resultados falsos positivos en las pruebas realizadas contra sueros de animales muy diferentes (Savage y cols., 1991).

Otros de los procedimientos utilizados en la detección del origen de las alimentaciones sanguíneas en mosquitos fueron desarrollados por el grupo de Sato, quienes utilizaron ADN-biotinizado y con el cual fueron capaces de detectar de 10-100 ng de ADN humano, discriminando muy bien entre las alimentaciones con sangre humana y las que no lo eran. Sin embargo, esta prueba da reacción cruzada con el ADN de los monos. Otro dato interesante, es que la prueba mostró ser específica y sensible para la identificación de alimentaciones sanguíneas con más de 100 horas después de la ingesta (Sato y cols., 1992).

Existe una técnica histológica, que sirve también para detectar el origen de las alimentaciones sanguíneas múltiples y que fue descrita en *Ae. aegypti*. Sin embargo esta prueba requiere de una intensa labor técnica; su utilización ha sido principalmente en estudios de comunidad de tipo longitudinal. Por medio de este método, se encontraron alimentaciones dobles por *Ae. aegypti* en cada ciclo gonotrófico (Scott y cols., 1993).

6.5 UTILIZACIÓN DE LA PRUEBA DE ELISA EN LA DETERMINACIÓN DEL ORIGEN DE LAS ALIMENTACIONES SANGUÍNEAS EN DÍPTEROS DIFERENTES DE *Ae. albopictus*

Una variedad de la prueba de ELISA se desarrollo, con la finalidad de identificar las fuentes de alimentación sanguínea en simúlidos y consistió en la utilización de un segundo anticuerpo biotinizado y un complejo de Peroxidasa Estreptavidina-Biotinizada. Esta modificación, le confirió una Sensibilidad para identificar correctamente el 100% de las alimentaciones sanguíneas después de 72 horas de haber sido ingeridas y el 80 % después de las 116 horas post-ingestión, en moscas capturadas en el campo a temperatura ambiente (Hunter y Bayley, 1991).

En otro estudio realizado en Kenia, se utilizó la prueba de ELISA con esporozoítos de *P. falciparum*. Se demostró la Sensibilidad de la técnica, pero mediante una valoración visual de la positividad de las muestras de *Anopheles spp.* colectadas en el campo. Se emplearon a seis personas observadoras familiarizadas con el método de ELISA, quienes evaluaron 5344 esporozoítos en preparaciones de ELISA y otros cuatro observadores lo hicieron pero solamente en 360 muestras, basándose en la intensidad de la coloración de la reacción producida por la peroxidasa. Los resultados mostraron un rango que fue 97.9-99% para las muestras de esporozoítos y de 90.3-96.1% para las alimentaciones sanguíneas. Estos resultados dieron una media estadística de Sensibilidad y Especificidad por arriba de 98% de las lecturas visuales, comparadas con las espectrofotométricas. En resumen, se habla de un error mínimo asociado a reacciones positivas determinadas visualmente para los ensayos de ELISA utilizados en los estudios de malaria en el campo (Beier y Koros, 1991).

Una vez mas Beier y su grupo, demostraron la posibilidad de identificar esporozoítos de *P. falciparum* mediante la prueba de ELISA en las glándulas salivales secas de las hembras de *Anopheles spp.* que fueron colocadas en portaobjetos y en viales. Para esto se usaron las glándulas de *An. gambiae* (Giles s.l.) y *An. funestus* (Giles) colectados en el oeste de Kenia. Las reacciones positivas se observaron en 86.6% de las muestras congeladas a -70°C ; 70.6% de las muestras que se conservaron secas en viales y 50.4% de las que se mantuvieron secas en portaobjetos. Una primera conclusión de este trabajo, fue que en el campo, no es práctico el congelamiento de las muestras, de tal manera, que los esporozoítos disecados pueden ser conservados adecuadamente por una simple remoción de las cubiertas y un secado de las

disecciones en los portaobjetos, para la posterior identificación por medio de la prueba de ELISA (Beier y cols., 1991)

Existe un antecedente en la literatura científica, el cual está íntimamente relacionado con la investigación que hicimos en *Ae. albopictus* y que consistió en la identificación de las alimentaciones sanguíneas en *Ae. aegypti* criados en el laboratorio y empleando la técnica de ELISA-Sandwich. Los resultados mostraron una eficiencia de 100% después de las 32 horas de alimentación y de 80% posterior a las 42 horas de la ingestión de sangre humana. Una prueba directa de ELISA, proporciona también el 100% de eficacia, pero hasta las 20 horas después de la alimentación. Se realizó también un estudio comparativo con 20 mosquitos colectados en el campo y se encontró que la prueba de ELISA-Sandwich fue superior, al ser comparada con la prueba directa (88 vs. 41% en la tasa de detección respectivamente) (Chow y cols., 1993).

Una prueba de ELISA de tipo competitiva Biotina/Avidina fue utilizada en España, para detectar el origen de las alimentaciones sanguíneas pero empleando *Phlebotomus perniciosus* (Newstead) colectados en cuatro regiones diferentes. En estos resultados, los autores pudieron encontrar algunas preferencias alimenticias. Por ejemplo, se señala que en algunos sitios, aun cuando existieron otros mamíferos como las cabras, los mosquitos prefirieron a las ovejas. En otros, la preferencia fueron los perros, aún cuando la proporción perros-hombre era bastante diferente (Colmenares y cols., 1995).

En otro estudio, en el cual más se utilizó una vez más la prueba de ELISA para identificar las fuentes de la alimentación sanguínea en *G. pallidipes* (Auisten) y *G. longipennis* (Corti) colectados en regiones boscosas y de la sabana en Nguruman al Suroeste de Kenia, durante la época de seca de 1992. De un total 1952 moscas colectadas, 339 (11.1%) contenían sangre y de ellas 155 (45.7%) fueron identificadas. De estos resultados llamó la atención el hallazgo de sangre de avestruces, lo que planteó la posibilidad de un estudio posterior enfocado a buscar la participación de estas aves en la epidemiología de la tripanosomiasis americana (Sasaki y cols., 1995)

0146164

6.6 ANÁLISIS DE LAS ALIMENTACIONES SANGUÍNEAS EN MOSQUITOS PARA OBSERVAR LOS PATRONES DE ALIMENTACIÓN

Uno de los investigadores pioneros en el estudio de los patrones de alimentación fue Tempelis, quien en una de sus clásicas revisiones planteó a 9 de ellos, los cuales se mencionan a continuación: 1) Casi completamente de mamíferos (anofelinos y *Cs. innornata*); 2) Aves (*Cs. melamura*, *Cx. peus*); 3). Aves y mamíferos (*Cx. pipiens quinquefasciatus*); 4). Casi exclusivamente de anfibios (*Cx. territans*); 5). Predominantemente de reptiles y ocasionalmente de algún animal homeotermo (*De. dyiari*); 6). Completamente de peces (*Ur. lateralis*); 7). Los que se alimentan tanto de animales poiquiloterms como de homeotermos (*De. epitedeus*); 8). De aves en la Primavera y en el Verano temprano, para a finales de éste, cambiar a mamíferos (*Cx. tarsalis*, *Cx. nigripalpus*) y 9). Casi exclusivamente de mamíferos en un área geográfica, mientras que en otra, lo hacen sobre aves (*Cx. erythroiorax*). Para hacer estas determinaciones, Tempelis y sus colaboradores, utilizaron la prueba de precipitina con algunas modificaciones, que además, fue la técnica básica durante algunos años. La Inhibición Pasiva de la Hemaglutinación, es una prueba, que hace 20 años ofrecía promesas en el sentido práctico, para la diferenciación de las especies, pero viene a ser más elaborada y difícil, en comparación con la prueba de la precipitina (Tempelis, 1975).

Entre el período comprendido entre Mayo de 1990-Junio de 1991 se realizó un estudio en una comunidad rural de Tailandia, empleando colectas semanales por aspiración de *Ae. aegypti*, además de utilizar la prueba de ELISA-Sandwich para examinar 1230 especímenes colectados de los cuales un 88% (de todas las alimentaciones detectables) fueron siempre de un solo hospedero (hombre), mientras que sólo un 7% fueron alimentaciones múltiples (dobles y triples), pero también humanas. De estos resultados los autores obtuvieron la probabilidad de 0.85 de la alimentación (>0.9) durante 12 de los 14 meses del estudio, y que nunca bajó. Las alimentaciones múltiples aumentan el riesgo de Dengue entre la población humana en Tailandia, de acuerdo con la estación (Scott y cols., 1993).

De los pocos trabajos realizados con *Ae. albopictus* y relacionados con las preferencias alimenticias, se encuentra éste, en el cual se colectaron mosquitos entre 1989-1991 con el uso de

una aspiradora, tanto en espacios rurales como urbanos, de varios estados de los EUA. Para la identificación de la sangre contenida en los mosquitos se utilizó la prueba de ELISA y la de precipitina y se obtuvieron resultados bastante diferentes como son: conejos, ratas, perros, vacas, humanos, ciervos, tortugas, ratones, mapaches, aves paseriformes y felinos en una proporción muy variada. Estos resultados hablan de la potencialidad del *Ae. albopictus* para transmitir arbovirosis, además de ser una plaga molesta, en aquellos lugares en donde existen las infestaciones (Niebylski y cols., 1994)

6.7 CÁLCULO DE LAS ALIMENTACIONES SANGUÍNEAS

Uno de los hallazgos relacionados con el cálculo del volumen de las alimentaciones sanguíneas en *Ae. Albopictus*, fue que éstos varían entre 1 y 6 nl, además de ser los vectores naturales de *Dirofilaria immitis* (nematodo que afecta el corazón de los perros en Japón). Otro resultado fue que *Ae. albopictus* prefirió alimentarse con cebo humano en lugar de cebo canino, cuando ambos fueron expuestos simultáneamente (Konishi, 1989).

Un último antecedente, que se encontró estrechamente relacionado con la investigación que se pretende desarrollar, fue el realizado en hembras de *Ae. aegypti* púridas de 10 días de edad, las cuales tienen un umbral de alimentación sanguínea elevado, (por la iniciación del desarrollo de los huevos), al ser comparadas con las nulíparas de 5 días de edad. Para esto, se les proporcionó sangre de aves marcadas con Cesio y Rubidio, con la finalidad de estudiar el efecto de la edad y el tamaño corporal en la frecuencia de alimentaciones múltiples. Cronológicamente, las hembras más viejas tienen una mayor frecuencia de alimentaciones sanguíneas múltiples, comparadas con las hembras jóvenes. A nivel de laboratorio las hembras de mayor tamaño, tienen una mayor frecuencia de alimentaciones sanguíneas múltiples, comparadas con las hembras de menor tamaño (De Xue y cols., 1995).

6.8 DENGUE

El concepto de Dengue que actualmente se maneja en la literatura médica, fue introducido como una traducción del swahili: *byenga* o *kidenga pepo* “golpe súbito provocado por un espíritu maligno”. Los vocablos posteriores de *knokkel-koorts* adjudicado en Indonesia en 1779 y de

breakbone fever o dandy fever en Filadelfia en 1780, fueron precisamente para describir la enfermedad que ahora se conoce como dengue (Halstead y cols. 1980)

El Dengue como enfermedad transmitida por un vector, se manifiesta como una infección causante de daño clínico en humanos y que puede ser de tipo progresivo, desde una forma subclínica, hasta severa, hemorrágica y mortal. La enfermedad febril no específica, es conocida como Dengue Clásico, la cual se considera "benigna", pero empleando los términos mas adecuados, sería "no fatal". Los factores involucrados que determinan que las personas desarrollen la forma clásica y/o la hemorrágica no están del todo claros, pero se puede ver influenciada por el tipo de virus y el estado inmunológico del individuo (Rosen, 1977).

La fiebre que se manifiesta en el Dengue Clásico, se presenta principalmente en jóvenes y adultos con un cuadro clínico que se caracteriza precisamente por un ataque repentino de fiebre, dolor de cabeza, alrededor de los ojos así como de tipo muscular y en las articulaciones, además de náuseas, vómito y edema en los ganglios linfáticos. El dolor persiste durante 3 a 7 días. Posteriormente empieza a disminuir, con el consecuente debilitamiento del paciente, ocasionado que éste pueda llegar a estar fuera de actividad durante varias semanas. (Gubler, 1981).

El Dengue Hemorrágico, viene a ser la forma fatal de la enfermedad FHD/SSD (Fiebre Hemorrágica de Dengue/Síndrome de Shock por Dengue) y se observa con mayor frecuencia en jóvenes menores de 15 años, sobretodo en niños, aunque puede también presentarse en adultos. Las manifestaciones clínicas que lo caracterizan, son una fiebre aguda y repentina, con signos y síntomas no específicos como la falta de apetito, vómitos y dolores abdominales que tienen una duración entre 2 y 7 días. Realmente es difícil diferenciar la FHD de otras enfermedades virales e infecciones por protozoarios (paludismo) durante las etapas de la enfermedad. Los jóvenes manifiestan una respiración acelerada, que no se presenta en otras enfermedades causadas por virus. La severidad del cuadro se hace manifiesta, cuando la temperatura corporal se eleva en varios grados mas, de lo normal. Esto ocasiona un deterioro inmediato en la salud del paciente, principalmente en una circulación sanguínea deficiente, manifestaciones hemorrágicas, shock y muerte, en caso de que el manejo del paciente no sea oportuno. (OPS, 1992).

La Fiebre por Dengue es conocida clínicamente desde hace 2 siglos, pero realmente la

causa de la enfermedad se descubrió en 1944. El virus del Dengue se aisló por primera vez de soldados que se encontraban en Calcuta, Nueva Guinea y Hawaii, los cuales fueron antigénicamente similares y que se designaron como Dengue 1 (DEN-1) y Dengue 2 (DEN-2). Años más tarde, en la epidemia de Manila, Filipinas ocurrida en 1952, se aislaron en pacientes con la forma Hemorrágica del Dengue otros dos Serotipos, el Dengue 3 (DEN-3) y el Dengue 4 (DEN-4). (Rush, 1789; Sabin, 1952).

El primer reporte documentado de la transmisión de la transmisión del virus por mosquitos lo realizó Graham en 1903. Bancroft por su parte demostró tres años más tarde que *Ae. aegypti* infectado con sangre de una persona durante la fase aguda de la enfermedad, fue capaz de transmitir el agente viral a otra persona después de un período de incubación de 10 días. (Graham, 1903; Bancroft, 1906).

El Dengue en las Américas ha sido descrito desde 1635, cuando los colonizadores franceses lo reportaron en las Indias occidentales, como una extraña dolencia a la que denominaron *coupe de barre*. Sin embargo, la primera epidemia se refiere hasta 1768 en Filadelfia, EUA. La presentación en las Américas desde 1817 hasta 1990 ha sido en intervalos muy irregulares (Gómez, 1992).

Con respecto a México, el serotipo causante del Dengue Clásico había sido hasta 1982, el DEN-1. Pero en 1983 fueron identificados los Serotipos DEN-2 y DEN-4 en los estados de Guerrero, Oaxaca y Chiapas. Esta situación promovió el aumento de las formas graves del dengue. En 1987, el registro de casos se elevó hasta 15,266, además de que en las localidades afectadas se presentaron casos de fiebre hemorrágica con casos fatales (Herrera, 1989).

Entre los arbovirus se incluyen también, a los agentes causales de las enfermedades epidémicas y epizooticas más importantes y devastadoras como lo son, el Dengue y la Fiebre Amarilla además de ser de distribución cosmopolita. En este grupo se incluyen las familias Togaviridae, Flaviviridae, Bunyaviridae y Rhabdoviridae (Reihle, 1989).

El concepto de Arbovirus, se aplica a todos los virus de vertebrados, que son transmitidos por los que se denominan vectores biológicos y pertenecen a los artrópodos, entre los que a su vez se pueden incluir mosquitos, culicidos, pulgas, chinches, simúlidos, etc. Una característica común de los Arbovirus, es el desarrollo en ciclos de transmisión y mantenimiento, de manera tal, que la información genética del virus, se expresa en dos sistemas biológicos filogenéticamente diferentes: vertebrados e invertebrados (Beaty y cols., 1988).

Existe la creencia, de que la mayor parte de los Arbovirus evolucionaron como parásitos de insectos y de manera secundaria o accidental infectaron a los vertebrados. La expresión de su virulencia en el vertebrado, se ha considerado como una medida en el grado de evolución del hospedero-agente, trayendo esto como consecuencia que los virus disminuyan la mortalidad. Por otra parte, la respuesta inmune del hospedero, aumenta la probabilidad de transmisión y supervivencia, sobretodo los que tienen un rango limitado de hospederos (Scott, 1988).

Los virus de los tipos DEN-1, DEN-2 DEN-3 y DEN-4, que son causantes del Dengue están clasificados dentro de la Familia Flaviviridae y del Género Flavivirus (Gómez y cols. 1992; OPS, 1992).

En los últimos 30 años, el aumento en la incidencia del Dengue ha sido dramático, sobretodo en los países tropicales de todo el mundo. De hecho, se piensa que una elevada de la población se encuentra en riesgo de adquirir esta infección. Las epidemias de los últimos años han producido millones de casos (Halstead, 1980).

En las zonas endémicas del trópico, la transmisión del Dengue se realiza durante todas las épocas del año. Sin embargo, existen regiones en donde el patrón clínico es diferente y en consecuencia, el aumento de la transmisión está asociado con la temporada de lluvias (Jumali y cols., 1979).

En las áreas que no son endémicas de Dengue, pero que en un momento dado presentan las condiciones propicias para la introducción de la enfermedad, se consideran como factores de riesgo importantes: 1) La cepa del virus que influye en la magnitud y la duración de la viremia en los humanos, 2) susceptibilidad de la población, 3) densidad, comportamiento y competencia de

las poblaciones del mosquito vector, 4) introducción del virus áreas donde la población local tiene contacto con la población de mosquitos (Gubler y cols., 1978).

El virus del dengue tiene 3 ciclos básicos de transmisión: 1) el Selvático, que involucra a primates y especies selváticas de *Aedes spp.*, 2) otro Rural o Semirural, en el que se involucran, tanto los humanos, como las especies peridomésticas de *Aedes spp.*, 3) Por último, el Urbano, que involucra a humanos y especies de *Aedes* domésticos. Pueden existir traslapes en los ciclos anteriormente mencionados, los cuales dependerán de la región y de las especies de mosquitos que participen. Solamente se conocen tres hospederos naturales del Virus del Dengue: el hombre, algunos primates y los mosquitos del género *Aedes spp.* (Rudnick, 1978).

Los vectores más importantes del dengue son *Ae. aegypti* y *Ae. albopictus*. Actualmente existen estudios de laboratorio, en los cuales se han demostrado la susceptibilidad, a la infección oral del Virus del Dengue, por una gran cantidad de cepas de mosquitos de ambas especies y de diferentes lugares. Sin embargo, los resultados de las investigaciones de Rosen y su grupo, demuestran que *Ae. albopictus* es más susceptible y un mejor hospedador del Virus del Dengue comparado con *Ae. aegypti* (Rosen y cols., 1987).

Unos de los factores más importantes que repercuten en el aumento de la transmisión del Dengue, es el movimiento de las poblaciones humanas, entre los que se encuentren infectados hacia los lugares en donde se puede transmitir la enfermedad; otro factor también, son las migraciones de personas de las áreas rurales a las ciudades, esto, con la finalidad de mejorar sus condiciones de vida, pero que se enfrentan a la realidad de escasez de viviendas y de servicios, ocasionando que improvisen lugares donde vivir, que por lo general son sitios insalubres y de hacinamiento, facilitando de esta manera la proliferación del vector, el contacto con los hospederos y finalmente el aumento de la transmisión del virus (Gubler, 1988).

La clasificación biológica de *Ae. albopictus* es : Clase: Insecta; Orden: Diptera; Familia: Culicidae; Subfamilia: Culicinae; Género: *Aedes*; Subgénero: *Stegomyia*; Especie: *albopictus* (Skuse) (Darsie, 1981).

VII. MATERIAL Y MÉTODOS

7.1 MATERIAL Y EQUIPO

Para realizar las pruebas de ELISA se utilizará el siguiente material: Bomba de vacío, papel filtro Wattman No. 1, tijeras, pinza perforadora, microplacas de 96 pozos cada una Dynatech No. 001-2401), lavadora para 8 pozos de las microplacas marca CORNING Modelo 26300-8, sustrato para Peroxidasa BABTS Marca Kirkegaard and Perry, homogenizadores, tubos de plástico con tapa para almacenamiento de muestras, puntas para micropipetas, sueros Kirkegaard and Perry, peroxidasa marcada, antisueros purificados de cabra marcados con peroxidasa: a) Anti-pollo (H+L), b) Anti-humano, c) Anti-perro, d) Anti-bovino y e) Anti-gato.

7.2 ÁREAS DE ESTUDIO

Se colectarán larvas de *Ae. albopictus* y adultos con la ayuda de un aspirador eléctrico en un tiradero de llantas de Reynosa, ciudad que se encuentra situada en la frontera con los Estados Unidos a 2 horas de Monterrey y en la ciudad de Matamoros, perteneciente también al estado de Tamaulipas, pero hacia el Golfo de México.

7.3 LUGARES DE TRABAJO

Laboratorio de Entomología Médica de la Facultad de Ciencias Biológicas, Unidad "B" de la U.A.N.L. y Dpto. de Parasitología Médica de la Facultad de Medicina Unidad Torreón, de la Universidad Autónoma de Coahuila,.

7.4 CRÍA DE LARVAS Y PUPAS DE *Ae. albopictus*

Para tener la certeza, de que los adultos que emerjan sean *Ae. albopictus*, las pupas, que siguen a la fase larval, se colocarán en pequeños recipientes con agua, dentro de botes de cartón de un galón de capacidad, que se emplean como pequeñas jaulas de emergencia. Los mosquitos recientemente emergidos que se vayan obteniendo, (hembras y machos) se observarán uno por uno, dentro del tubo transparente del capturador bucal, para ser separados de aquellos que no pertenezcan al género, ni la especie de interés, en la presente investigación (*Ae. aegypti*, *Cx.*

pipiens, *Chironomus* sp., etc.).

7.5 OBTENCIÓN DE ADULTOS Y REPRODUCCIÓN DE *Ae. albopictus*

Por último, serán introducidos en una jaula de madera en forma de cubo, con paredes de tela mosquitera de 60 cm. por lado, en donde se les proporcionará el alimento necesario para subsistir (sangre humana o de conejo para las hembras, así como un trozo de algodón impregnado de agua endulzada con miel para los machos), y también un recipiente con agua cubierto con una servilleta de papel que siempre se mantenga humedecida, y que servirá para que las hembras realicen ahí la postura de los huevecillos. Estas servilletas serán cambiadas cada tercer ó cuatro día, (según la cantidad de huevecillos que se observen a simple vista) e inmediatamente se colocarán en una cámara húmeda durante 24 horas, que es el tiempo mínimo requerido, para que dentro de los huevecillos, se realice la embriogénesis en un medio ambiente con éstas características. Transcurrido este tiempo, las servilletas serán retiradas de la cámara y se colgarán, con la finalidad de que se sequen a la temperatura ambiente del insectario, ya sea para almacenar los huevecillos adheridos al papel, o bien, para ser utilizadas inmediatamente en el mantenimiento de la colonia de mosquitos, colocándolas en una charola con agua tibia y previamente reposada por un tiempo mínimo de 12 horas, para que se evapore el cloro disuelto.

7.6 OBTENCIÓN DE NUEVAS GENERACIONES DE *Ae. albopictus*

Las larvas de primer instar que vayan emergiendo, se pasarán a una charola con agua reposada y limpia, con ayuda de una gotero, y se les proporcionará alimento para perros finamente molido y cernido. Se debe tener cuidado de cambiar el agua, una vez que ésta se empiece a enturbiar, para evitar la mortalidad por el desarrollo de hongos. Esta operación se realiza, utilizando un pedazo de tela que se coloca sobre un cedazo de plástico, a través de la cual se hace una especie de colador y al mismo tiempo se enjuagan con mucho cuidado las pequeñas larvas, así como la charola en la que estaban contenidas. Una vez realizada esta operación, se agrega agua reposada y limpia, alimento en pequeñas cantidades y por último se regresan las larvas a su medio ambiente.

7.7 VIGILANCIA Y ALIMENTACIÓN DE LOS NUEVOS ESPECÍMENES

Día con día, se tendrán que estar revisando las charolas con agua, para que, una vez que se empiecen a presentar las pupas, retirarlas con ayuda de un gotero y colocarlas por separado en un pequeño recipiente de plástico, que por supuesto también deberá contener agua, se introducirá en un bote de cartón de un galón de capacidad, para que ahí emerjan los adultos de ambos sexos, los cuales serán alimentados, con un algodón humedecido con agua endulzada con miel y así permanecerán, durante 24 horas para que copulen. Como último paso, a las hembras, se les pondrá en contacto con los 5 diferentes hospederos (humanos, perros, gatos, bovinos y pollos) que servirán para su alimentación sanguínea.

Cuando las hembras de *Ae. albopictus* se hayan alimentado a repleción (con la sangre de alguno de los cinco hospederos a estudiar), se les capturará dentro de la jaula de emergencia, con ayuda de un aspirador bucal, para sacrificarlas por congelamiento durante 15 minutos a 4⁰C e inmediatamente después, proceder a cortarles el abdomen, con el cual se impregnarán los trozos de papel litro y serán secados a temperatura ambiente para finalmente, ser conservados en el congelador, hasta que se vayan a realizar las pruebas de ELISA.

7.8 REGULACIÓN DEL MEDIO AMBIENTE DEL INSECTARIO

Las condiciones ambientales del insectario, como son la humedad relativa de 50-80%, una temperatura de 25⁰C y un fotoperíodo de 10-12 horas de luz, son muy importantes para la supervivencia y el óptimo desarrollo de los mosquitos en cautiverio. Para esto, se requiere la utilización de humidificadores, la instalación de un aparato de aire acondicionado y de un regulador (timer) que encienda y apague las luces del insectario, de acuerdo con el fotoperíodo que se desea utilizar (por ejemplo 12 horas de luz, 12 horas de oscuridad).

El grupo de Hagen y cols., emplearon un sistema de alimentación simple para el mantenimiento rutinario de mosquitos, utilizando una membrana para envolver heridas y que comercialmente se describe como una gasa nylon (Hagen y Grunewald en 1990).

7.9 DISEÑO EXPERIMENTAL Y ANÁLISIS DE DATOS

Para considerar que la prueba de ELISA tiene validez, que se refiere al grado en que una condición observada refleja la situación verdadera, o bien la situación establecida por otros criterios que se piensa reflejan la situación verdadera con mayor precisión (Está constituida de: Sensibilidad, la cual se define como la capacidad de una prueba para identificar correctamente a quienes tienen la característica y Especificidad que es la capacidad de una prueba para identificar correctamente a quienes **NO** tienen la característica) se emplearán las siguientes fórmulas:

$$\text{Sensibilidad*} = \frac{\text{Positivos verdaderos}}{\text{Positivos verdaderos} + \text{Falsos negativos}}$$
$$\text{Especificidad*} = \frac{\text{Negativos verdaderos}}{\text{Negativos verdaderos} + \text{Falsos positivos}}$$

* a menudo se expresan como porcentajes.(Mac Mahon y Pugh 1988; Mausner y Kramer 1985).

Con la finalidad de determinar la Sensibilidad y la Especificidad de la prueba de ELISA en relación con la digestión de la sangre ingerida, se alimentarán grupos de 20 especímenes de *Ae. albopictus* sobre cebo humano y se congelarán o se anestesiarán con cloroformo, para separarles el abdomen.

7.10 CAPTURA DE MOSQUITOS DE CAMPO

Para determinar el origen de las alimentaciones sanguíneas en *Ae. albopictus* de algunas localidades importantes de nuestro país, se capturarán mosquitos en Matamoros y Reynosa, Tamps. con ayuda de un aspirador eléctrico y a todas aquellas hembras que contengan sangre, se les sacrificará y separará el abdomen para impregnar trozos de papel filtro, los cuales se secarán a temperatura ambiente y después se almacenarán a 4°C hasta que se realicen la pruebas de ELISA.

Para investigar la capacidad de ELISA y distinguir entre alimentaciones crípticas, se alimentarán 20 mosquitos con cebo humano y a las 12 horas se alimentarán con sangre de perro.

De ser posible se alimentarán sobre humano y sobre gato. Posteriormente se realizarán los pasos de sacrificar las hembras, cortarles el abdomen, impregnar, secar y almacenar a 4⁰C los trozos de papel filtro, hasta la realización del ensayo Inmuno-Enzimático.

Por último, para la realización de la curva de calibración (Absorbencia vs. Tiempo) de la prueba de ELISA, con la finalidad de investigar el tiempo post alimentación ideal, y de esta manera conocer el origen de la sangre contenida en los mosquitos, se alimentarán 60 hembras de *Ae. albopictus* que serán sacrificadas por congelamiento, en grupos de tres especímenes cada cuatro horas, durante un período de tiempo de 72 horas. Los pasos para la obtención de las muestras de sangre en los trozos de papel filtro, serán los mismos a los experimentos anteriores.

Para realizar las pruebas de ELISA se utilizará el protocolo descrito por Beier y cols. 1988. J. Med. Entomol. 25(1): 9-16, que se describe a continuación:

7.11 IDENTIFICACIÓN DE LAS ALIMENTACIONES SANGUÍNEAS

Para la identificación del papel filtro impregnado con las alimentaciones sanguíneas se utilizó una prueba indirecta de ELISA descrita por Beier y cols. (1988) y modificada por Loyola y cols. (1990). Los mosquitos alimentados con sangre de los diferentes hospederos, se colocan en el congelador durante 5-10 minutos con la finalidad de aletargarlos, o bien se pueden anestesiar con ayuda de un algodón impregnado con éter etílico y colocando las hembras de los mosquitos dentro de una jaula pequeña, la que a su vez se introduce en un recipiente cerrado, para de esta manera proceder a poder cortarles el abdomen con facilidad, el cual, una vez separado del resto del mosquito, se coloca en un papel filtro y se aplasta en dicho papel con la finalidad de impregnarlo. La mancha se delimita con lápiz, se seca bien y se guarda en una bolsa con un desecador. Se corta el área delimitada del papel filtro que abarca el abdomen del mosquito aplastado, se coloca en un tubo de ensaye previamente marcado y se le agregan 200 µl de un amortiguador de solución salina con fosfato (0.1 g/litro de PBS pH 7.2) y se mantiene a temperatura ambiente por dos horas o bien durante la noche a 4⁰C; La otra opción es moler el mosquito completo, o en su lugar el abdomen del mosquito en 50 µl de PBS-Timerosal, enjuague dos veces el émbolo con 75 µl de PBS-T. (Volumen Total = 200 µl). Agregue 45 µl de PBS (o PBS-T) a los pozos de la microplaca (Dynatech No. 001-2401) y añada 5 µl de extracto del

mosquito (Dilución 1:10). Cubra la placa y logre mantenerla durante 3 h a temperatura ambiente. Lave la placa 4 veces con PBS-Tw 20 (0.5 ml. de Tween 20 por litro de PBS). Diluya el conjugado peroxidasa anti-hospedero IgO (H+L) anticuerpo 1:100 en amortiguador bloqueador con caseína hervida (BB). Esta solución deberá contener también, una dilución 1:500 de suero de otros posibles hospederos que estén presentes en el área de colecta de los mosquitos, por ejemplo, agregue suero bovino si hay vacunos en el área, con la finalidad de evitar una reacción cruzada. Esto es esencial para prevenir reacciones falsas positivas. Agregue 50 µl por pozo, cubra e incube durante una hora. Lave 4 veces la placa con PBS-Tw 20. Agregue 100 µl del sustrato de la peroxidasa. Lea la placa a 414 nm después de 30 minutos.

- A) El PBS y no el BB debe de ser utilizado en los pasos 1 y 2 y
- B) En el conjugado de peroxidasa anti-hospedero anticuerpo, la dilución está basada en el uso de reactivos Kirkegaard and Perry a 0.5 mg/ml glicerina-agua (1:1). Los reactivos de otras fuentes pueden requerir diferentes concentraciones cuando se trabajan.

Los resultados de las pruebas se consideraron como positivos cuando el valor de su Absorbencia fue mayor de dos veces al valor promedio de cinco controles negativos que fueron equivalentes a mosquitos machos y hembras sin alimentar. Las alimentaciones sanguíneas mezcladas de hembras de mosquitos fueron solamente de dos hospederos diferentes.

7.12 ANÁLISIS DE DATOS

En casi todas las determinaciones realizadas sobre las alimentaciones sanguíneas en *Ae. albopictus*, fueron hechas por duplicado y en varios experimentos, utilizando cinco hospederos diferentes que fueron: Humano, Perro, Gato, Pollo y Bovino

VIII. RESULTADOS

a). Evaluación de la Sensibilidad y Especificidad de la prueba de ELISA-Sandwich.

Para realizar este objetivo del proyecto, se utilizaron las fórmulas descritas en el punto 7.9 (Diseño Experimental y Análisis de Datos). Los resultados obtenidos sobre la Sensibilidad y Especificidad de la prueba de ELISA-Sandwich con *Aedes albopictus* criados en el laboratorio, muestran que cuando se utilizan las diluciones 1:10 hasta 1:70, para los mosquitos alimentados con la sangre de los cinco hospederos estudiados (humano, perro, gato, pollo y bovino), los valores fueron de 100%; en el caso de la Especificidad para los mosquitos alimentados con sangre humana, las determinaciones dieron valores desde 0 hasta 75% (Tabla 1). Finalmente se observa, que los valores de la Sensibilidad fueron de 0%, para la dilución de 1:80 de los mosquitos alimentados con sangre de perro, gato, pollo y bovino. Sin embargo, el detectar valores para la Especificidad de 75% en el caso de las hembras alimentadas con sangre humana, es un punto que se discute más adelante.

b). Determinación del origen de las alimentaciones sanguíneas en *Aedes albopictus* capturados en algunos criaderos importantes del país (Matamoros y Reynosa, Tamps.)

Una vez que se realizaron las determinaciones de estandarización de la técnica, para obtener los datos iniciales, relacionados con encontrar la dilución ideal para la prueba de ELISA, se procedió a utilizar de nuevo esta técnica, pero ahora para indagar la procedencia de la sangre, con la que se alimentaron mosquitos silvestres, capturados en criaderos de dos ciudades del estado de Tamaulipas (Reynosa y Matamoros), tal y como se describe en los puntos 7.10 y 7.11 de Material y Métodos.

Los resultados muestran, que de las seis hembras perfectamente identificadas como de *Ae. albopictus*, capturadas en Matamoros, en las que se observaron sus abdómenes llenos de sangre a repleción, en tres se identificó sangre humana y sangre de perro (mosquitos 1, 3 y 4 respectivamente). En otros dos mosquitos diferentes, también se lograron detectar ingestas de sangre de bovino (mosquitos 5 y 6). (Tabla y Gráfica 2).

En relación con las ocho hembras capturadas en Reynosa, los resultados fueron: cuatro contenían sangre humana y sangre de perro (en tres, mosquitos 1, 5 y 8), junto con otra diferente del grupo anterior (mosquito 7). En los mosquitos 2 y 3, se encontró sangre de gato y por último en los mosquitos 4 y 6, se identificó sangre de bovino (Tabla y Gráfica 3).

Tabla 2A. Resultados de la prueba de ELISA obtenidos en hembras de *Aedes albopictus* silvestres capturadas en Matamoros, Tamps.

Sangre	MOSQ 1	Control	MOSQ 2	Control	MOSQ 3	Control
Suero anti:						
Humano	0.884	0.147	0.181	0.161	1.222	0.159
Perro	0.705	0.139	0.185	0.150	0.996	0.158
Gato	0.225	0.149	0.199	0.149	0.185	0.149
Pollo	0.237	0.14	0.191	0.137	0.183	0.150
Bovino	0.21	0.148	0.191	0.147	0.194	0.157
Sangre						
	MOSQ 4	Control	MOSQ 5	Control	MOSQ 6	Control
Suero anti:						
Humano	0.867	0.162	0.157	0.151	0.15	0.152
Perro	0.937	0.167	0.165	0.152	0.164	0.142
Gato	0.167	0.187	0.155	0.158	0.159	0.151
Pollo	0.18	0.150	0.186	0.149	0.184	0.155
Bovino	0.156	0.157	0.901	0.153	0.811	0.143

Gráfica 2A. Pruebas de ELISA realizadas, en seis hembras de *Aedes albopictus* silvestres, capturadas en Matamoros, Tams. que mostraban alimentación sanguínea (dil. 1:50)

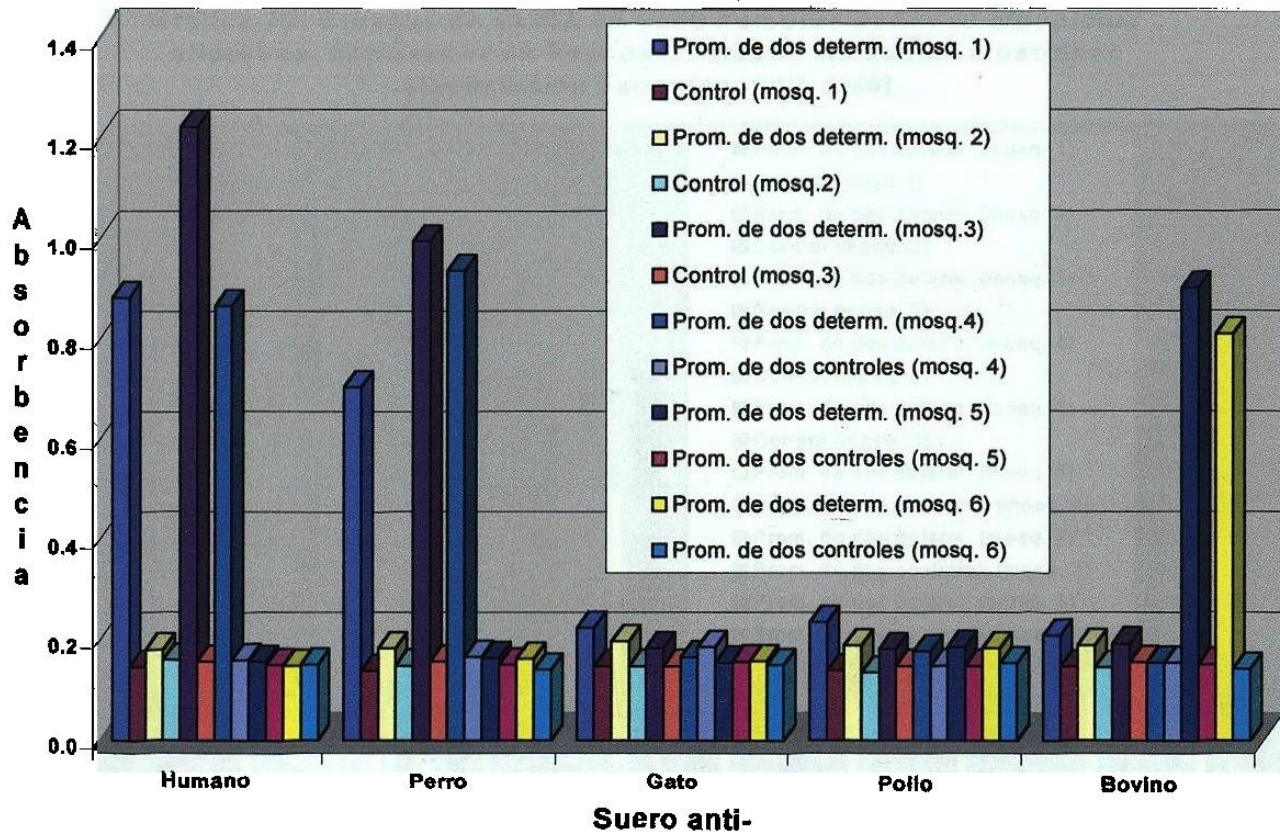
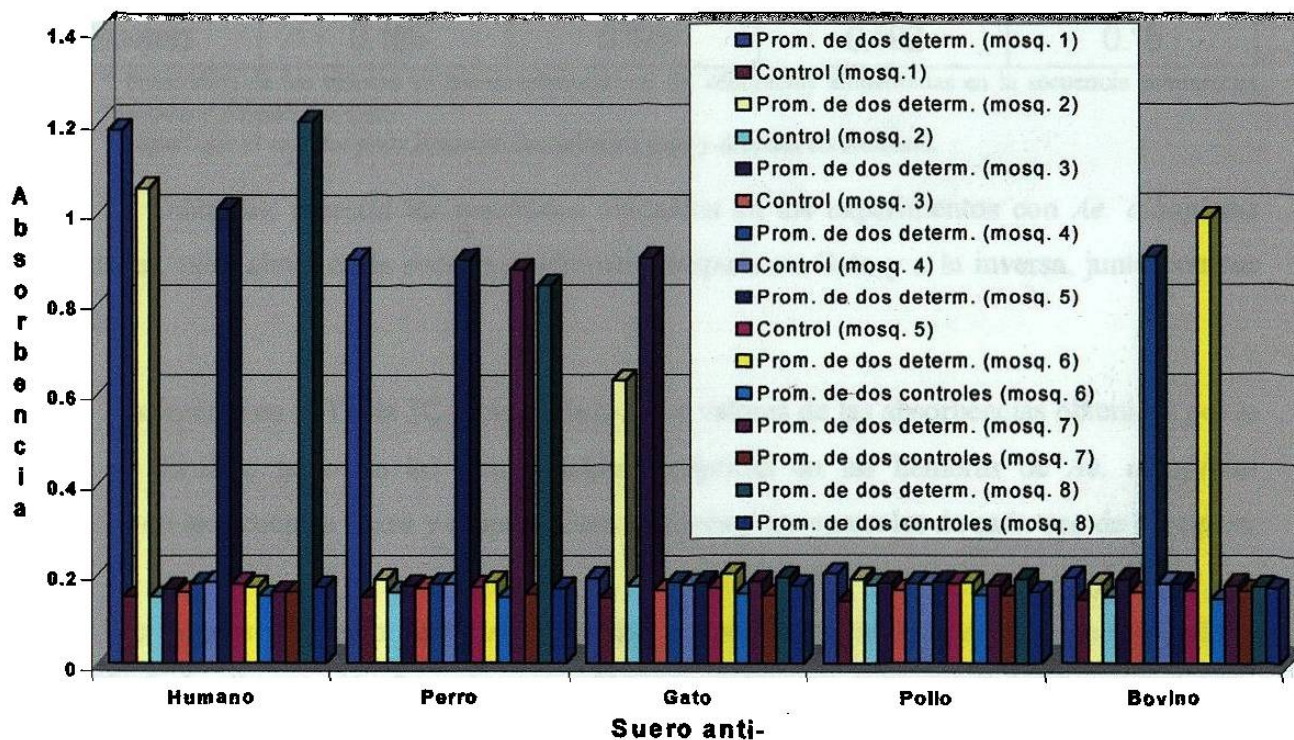


Tabla 2B. Resultados de la prueba de ELISA obtenidos en hembras de *Aedes albopictus* silvestres capturadas en Matamoros, Tamps.

Sangre	MOSQ 1	Control	MOSQ 2	Control	MOSQ 3	Control	MOSQ 4	Control
Suero anti:								
Humano	1.1855	0.149	1.056	0.149	0.168	0.16	0.18	0.183
Perro	0.899	0.147	0.188	0.159	0.174	0.169	0.178	0.179
Gato	0.192	0.146	0.628	0.174	0.901	0.165	0.182	0.177
Pollo	0.1995	0.14	0.189	0.176	0.181	0.164	0.181	0.179
Bovino	0.1935	0.141	0.179	0.149	0.189	0.159	0.902	0.181
Sangre	MOSQ 5	Control	MOSQ 6	Control	MOSQ 7	Control	MOSQ 8	Control
Suero anti:								
Humano	1.011	0.179	0.1715	0.152	0.16	0.16	1.203	0.171
Perro	0.897	0.172	0.182	0.142	0.876	0.155	0.841	0.169
Gato	0.181	0.169	0.1995	0.151	0.183	0.151	0.191	0.173
Pollo	0.183	0.181	0.1825	0.155	0.176	0.153	0.19	0.16
Bovino	0.18	0.165	0.9865	0.143	0.177	0.163	0.173	0.169

Gráfica 2B. Pruebas de ELISA en ocho hembras de *Aedes albopictus* silvestres, capturadas en Reynosa, Tamps. las cuales mostraban alimentación sanguínea (dil. 1:50)



La detección de la sangre de perro, en tres de las hembras en las que también se encontró sangre humana, tanto en las capturadas en Matamoros como en Reynosa, es un punto que se discutirá más adelante en la sección correspondiente, así como en las conclusiones.

c). Investigación de la capacidad del ensayo Inmuno-Enzimático, para distinguir las alimentaciones crípticas (sangre ingerida por las hembras de los mosquitos procedentes de 2 ó más hospederos). Los resultados relacionados con este objetivo se muestran en las Tablas 3A en la que se incluyen los promedios de las absorbancias de los experimentos realizados con *Ae. albopictus* alimentadas sobre Humano y después en Perro, los promedios en la secuencia Perro y después Humano y los controles correspondientes para cada caso.

Tabla 3A. Utilización de la prueba de ELISA para investigar las alimentaciones en hembras de *Ae. albopictus* alimentadas primero en Humano, después en Perro y viceversa

Suero anti-	Prom H-P	Cntrl H-P	Prom P-H	Cntrl P-H
Humano	0.8905	0.183	0.7755	0.1545
Perro	0.728	0.1815	0.9505	0.1555
Gato	0.1905	0.18	0.2025	0.156
Pollo	0.195	0.183	0.2045	0.1555
Bovino	0.185	0.179	0.192	0.15

* Promedios de los valores de las absorbancias en *Ae. albopictus* alimentadas en la secuencia primero en Humano y después en Gato

** Igual que el anterior pero la secuencia: primero gato y después en Humano.

La Tabla 3B, muestra los resultados obtenidos en los experimentos con *Ae. albopictus* alimentadas, pero ahora en la secuencia Humano después en Gato y a la inversa, junto con sus controles.

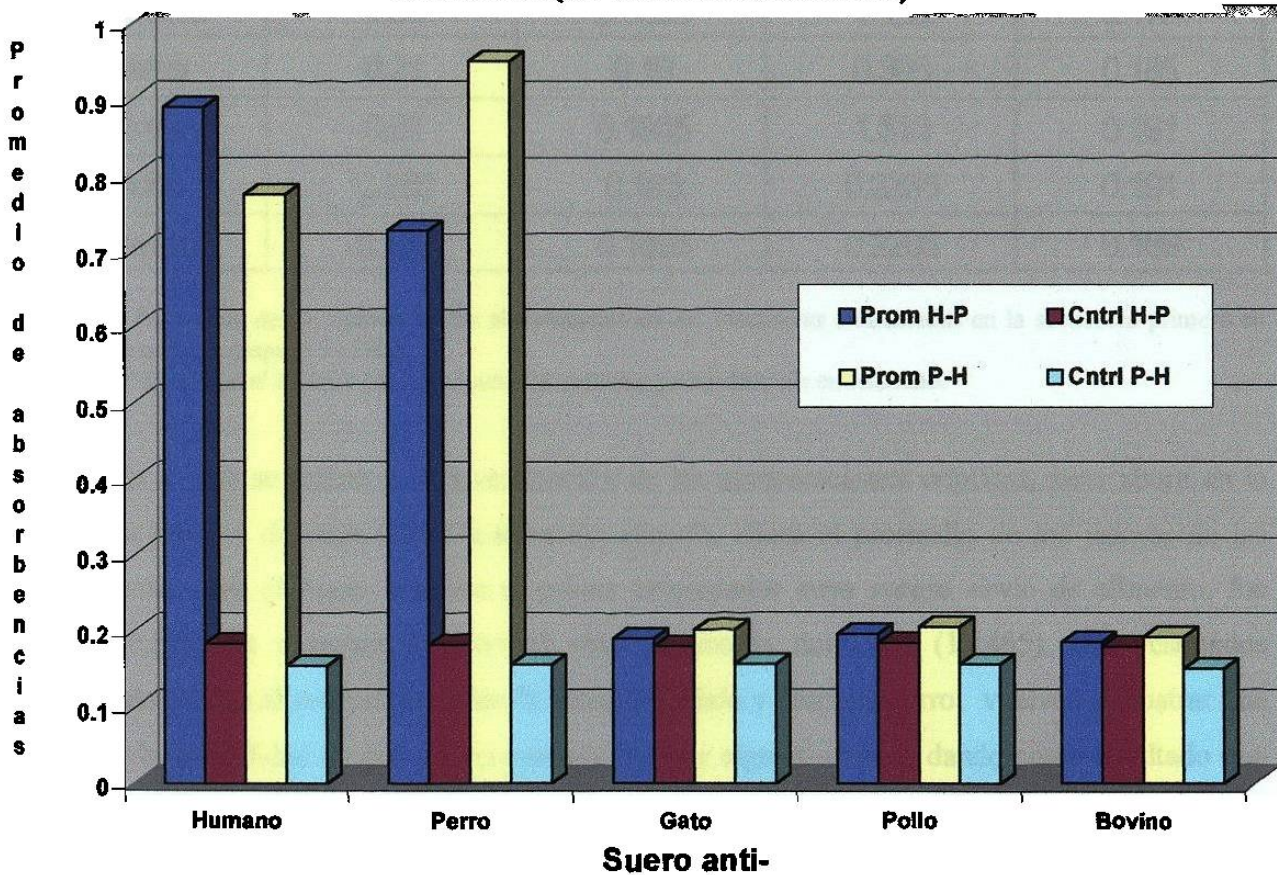
Finalmente en la Tabla 3C están incluidos los valores de las absorbancias obtenidas por la prueba de ELISA, tanto de las alimentaciones crípticas en las hembras de *Ae. albopictus* realizadas en la secuencia Perro y después Gato, al revés y los controles de cada uno de los casos.

Los valores promedio de las absorbancias muestran ser mayores en Humano, cuando la secuencia de la alimentación fue primero en Humano y después en perro (0.8905 contra 0.728).

En la parte complementaria (primero en Perro y después en Humano) se presenta una situación parecida, los valores promedio de las absorbencias son mayores en el Perro en comparación con las del Humano (0.9505 contra 0.7755). (Tabla y Gráfica 3A).

Se incluyen también las columnas de los controles para cada caso

Gráfica 3A. Utilización de la prueba de ELISA para determinar las alimentaciones crípticas en *Ae. albopictus* alimentadas en dos hospederos diferentes (se indica la secuencia)



Las alimentaciones crípticas realizadas en *Ae. albopictus* alimentadas en la secuencia primero en Humano y después en Gato, muestran un comportamiento similar a los resultados que se muestran en la Tabla 4a, porque los valores promedio de la absorbencias son de 1.04, cuando se alimentaron inicialmente con sangre Humana y de 0.87 cuando lo hace con sangre Gato. Al invertir la secuencia (primero en Gato y después en Humano), los valores también se invierten, es decir, que el valor de 1.513 corresponde a la alimentación sobre el Gato, que en esta secuencia

fue la inicial, y el valor de 1.123 corresponde a la complementaria sobre Humano (Tabla y Gráfica 3B).

Tabla 3B. Utilización de la prueba de ELISA para investigar las alimentaciones en hembras de *Ae. albopictus* alimentadas primero en Humano, después en Gato y viceversa.

Suero anti-	Prom H-G *	Cntrl H-G	Prom G-H**	Cntrl G-H
Humano	1.04	0.1865	1.123	0.179
Perro	0.21	0.19	0.308	0.185
Gato	0.87	0.1905	1.513	0.191
Pollo	0.250	0.183	0.2285	0.191
Bovino	0.183	0.1895	0.2205	0.189

* Promedios de los valores de las absorbancias en *Ae. albopictus* alimentadas en la secuencia primero en Humano y después en Gato

** Igual que el anterior pero la secuencia: primero gato y después en Humano.

En lo que se refiere a la investigación de las alimentaciones crípticas, pero ahora en la secuencia Perro y después Gato, la situación cambia, ahora el promedio de los valores de las absorbancias para el Perro, que fue el primer hospedador cuya sangre sirvió de alimento, fue menor (0.876) en comparación con el valor promedio del Gato (1.1465). Los resultados encontrados en las alimentaciones con la secuencia Gato y después Perro, vuelven a mostrar una vez más, la posibilidad de que la secuencia influya de alguna manera, dando como resultado que los valores de las absorbancias en el Gato, cuando este fue el primer hospedero en donde se alimentaron, en el experimento complementario, fueran de 0.9535 y los de Perro 0.7525 (Tabla y Gráfica 3C).