

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE CHIHUAHUA

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE
CHIHUAHUA

**BIODIVERSIDAD DE MOSQUITOS DE INTERÉS EN
ENFERMEDADES TRANSMITIDAS POR VECTOR EN LA CIUDAD DE
CHIHUAHUA**

POR:

Q.B.P. Rodolfo González Peña

TESIS PRESENTADA COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE:

Maestría en Ciencias en Biotecnología

CHIHUAHUA, CHIH., MÉXICO

ABRIL 2021

CARTA DE LIBERACIÓN DE COMITÉ DE TESIS



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE
CHIHUAHUA

Chihuahua, Chih., a 6 de abril de 2021.

Oficio: 45/CA/SIP/21

Dr. Ildebrando Pérez Reyes
Secretario de Investigación y Posgrado
Facultad de Ciencias Químicas
Universidad Autónoma de Chihuahua
P R E S E N T E

Los integrantes del comité, informamos a Usted que efectuamos la revisión de la tesis intitulada: **Biodiversidad de mosquitos de interés en enfermedades transmitidas por vector en la ciudad de Chihuahua**, presentada por el **Q.B.P. Rodolfo González Peña**, alumno del programa de Maestría en Ciencias en Biotecnología.

Después de la revisión, indicamos al tesista las correcciones que eran necesarias efectuar y habiéndolas realizado, manifestamos que la tesis, de la cual adjuntamos un ejemplar, ha cumplido con los objetivos señalados por el Comité de Tesis, por lo que puede ser considerada como adecuada para que se proceda con los trámites para la presentación de su Examen de Grado.

Atentamente
"Por la ciencia para bien del hombre"



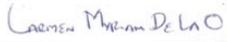
Dr. Javier Alfonso Garza Hernández
Co-director de tesis



Dra. Guadalupe Virginia Nevárez Moorillón
Asesora de tesis



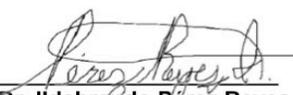
Dr. Carlos Arturo Rodríguez Alarcón
Asesor de tesis



M.C. Carmen Myriam de la O Contreras
Asesora de tesis



Dr. Jaime Raúl Adame Gallegos
Co-Director de tesis



Dr. Ildebrando Pérez Reyes
Secretario de Investigación y Posgrado



***El que suscribe certifica que las firmas que aparecen en esta acta, son auténticas, y las mismas que utilizan los C. Profesores mencionados.

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
Circuito Universitario
Campus Universitario #2 C.P. 31125
Tel. +52 (614) 236 6000
Chihuahua, Chihuahua, México
<http://www.fcq.uach.mx>

HOJA DE FIRMAS

Chihuahua, Chihuahua a 26 de marzo de 2021.

Dr. Ildebrando Pérez Reyes
Secretario de Investigación y Posgrado
Facultad de Ciencias Químicas
Universidad Autónoma de Chihuahua
P R E S E N T E

Por este conducto le comunicamos la tesis presentada por el alumno **Q.B.P. Rodolfo González Peña** para la obtención de grado de Maestro en Ciencias en Biotecnología y titulada: **“Biodiversidad de mosquitos de interés en enfermedades transmitidas por vector en la ciudad de Chihuahua”**, ha sido revisada por nosotros y liberada para su presentación y revisión por el Comité de Tesis.

Quedamos de Ud.,



Dr. Javier Alfonso Garza Hernández
Co-Director



Dr. Jaime Raúl Adame Gallegos
Co-Director

Este proyecto de tesis se realizó en el Laboratorio de Biotecnología IV de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Chihuahua en conjunto con el Laboratorio de Patología Clínica Veterinaria y Biología Molecular del Instituto de Ciencias Biomédicas de la Universidad Autónoma de Ciudad Juárez. El autor del trabajo recibió beca del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT; No. de registro **963298**).

DEDICATORIA

“En este lugar perdemos demasiado tiempo mirando hacia atrás. **Camina hacia el futuro**, abriendo nuevas puertas y probando cosas nuevas, se curioso... porque nuestra curiosidad siempre nos conduce por nuevos caminos.”

-Walt Disney-

A mi familia, por todo el cariño y todo el apoyo que siempre me brindan. Que a pesar de los altibajos, están ahí para darme ánimos y no dejarme cae. ¡Muchísimas gracias, los amo!.

A mí mismo, porque a pesar de todas las situaciones de vida, conflictos intrapersonales y de más, siempre he buscado la manera de seguir adelante, con ese positivismo que me caracteriza. Gracias por cumplir esta meta, es un logro bastante satisfactorio y sólo me queda decir:

¡Jamás te rindas, sigue luchando por tus sueños!

AGRADECIMIENTOS

En primera instancia, quiero agradecer a Dios por el don de la vida, por darme la oportunidad de tener una extraordinaria familia, de conocer gente excepcional y de llenarme de bendiciones.

A mi papá, por ser un ejemplo a seguir, por siempre apoyarme (a pesar de algunas malas decisiones), por aconsejarme y guiarme en ciertas situaciones de vida. Te agradezco por estar ahí siempre, en los momentos malos y en los buenos; te admiro muchísimo y te amo con todo mi corazón. A Raquel, a mi hermanos Braulio, Bruno y Bernardo, les agradezco por todo el cariño y el apoyo incondicional que me brindan, los amo.

A mi hermana, por siempre estar a mi lado, por ser mi mejor amiga y confidente. Gracias por aguantarme en mis malos ratos, por siempre apoyarme en todo momento, por motivarme a seguir mis sueños, por amarme tanto como lo haces. Eres la mejor hermana del mundo, sabes que te adoro con todo mi corazón y que ahí estaré para ti cuando me necesites. Por siempre FMA brothers ¡Te amo Juanita!.

A mi mamá, por todo el cariño y el apoyo que me brindas. Gracias por tus consejos, por siempre escucharme y por motivarme a jamás rendirme. Te amo madre.

Al Dr. Jaime Adame y al Dr. Alfonso Garza, por dejarme formar parte de su equipo de trabajo, ha sido una experiencia increíble. Gracias por apoyarme y guiarme durante estos dos años y medio (casi), he aprendido muchísimas cosas en este tiempo, tanto en el ámbito académico como en el personal. Agradezco todos los consejos sobre la vida, la escuela, la investigación, entre otras cosas; por las experiencias y las anécdotas de las salidas a campo que hemos realizado en estos dos últimos años (y las que faltan). Gracias por su amistad, los aprecio muchísimo a ambos y espero poder seguir trabajando con ustedes mucho más tiempo, que aún quedan muchas cosas por hacer. Los admiro muchísimo, son un ejemplo a seguir.

A los doctores Carlos Rodriguez, Ezequiel Rubio, Erick De Luna y Viridiana Laredo, gracias por todas las experiencias, los consejos, las anécdotas y de más, pero sobre todo, por su amistad. Son un equipo de trabajo extraordinario y los admiro muchísimo a todos. A la Dra. Diana Beristain, por el apoyo brindado para el uso de las instalaciones y equipo del Laboratorio de Patología Clínica Veterinaria y Biología Molecular del Instituto de Ciencias Biomédicas de la Universidad Autónoma de Ciudad Juárez. A todos los profesores que me dieron clase, por brindarme sus conocimientos, por su apoyo y orientación en mi formación académica. Muchas gracias.

A mi familia de la facultad, mis compañeros de generación, mis hermanos: Susy, Daniel y Rodrigo. Gracias por todas las experiencias juntos, los quiero con todo mi corazón chicos. Susy, gracias por tu amistad, por siempre estar ahí y apoyarme en todo momento, por motivarme a seguir en los momentos difíciles. Sabes que eres ya como de mi familia. Daniel, gracias por tu amistad, por el apoyo y sobre todo, las pláticas extensas y unas buenas heladas con Mötley F*cking Crüe y José José. Rodrigo, gracias por tu amistad, sé que casi no nos vemos, pero siempre es un gusto echar la platicada y de más contigo, te admiro un chingo por lo inteligente que eres, que sabes de todo, que siempre estás dispuesto a echarle la mano a quien lo necesite (sobre todo a nosotros en clase de bioquímica o biomol jaja). Los adoro amigos, son y serán siempre muy especiales para mi. Gracias a todos los compañeros de la facultad que hicieron una estancia bastante amena (antes de la contingencia), por las risas, las pláticas y las tazas de café compartidas con los chicos de Biotecnología IV y de más.

Al Dr. Antonio Triana y a la Dra. Blanca Rivera, muchas gracias por el cariño y el apoyo que me brindaron, sobre todo por su amistad. Agradezco todos los consejos, pláticas, risas y de más. Gracias por motivarme a continuar con mi pasión por ser investigador, por compartir sus experiencias y guiarme en ciertas situaciones de vida. Los aprecio muchísimo, son personas extraordinarias.



ÍNDICE

INDICE DE FIGURAS	vii
INDICE DE TABLAS	viii
LISTA DE ABREVIATURAS	ix
1. RESUMEN	1
1.1 ABSTRACT	2
2. INTRODUCCIÓN.....	3
3. ANTECEDENTES	5
3.1 Enfermedades transmitidas por vector.....	5
3.2 ETV en México.	7
3.3 Mosquitos (Diptera: Culicidae).	9
3.3.1 Ciclo de vida.....	11
3.3.2 Cementerios: potenciales criaderos de mosquitos.....	13
3.3.3 Competencia vectorial de patógenos.....	14
3.4 Aspectos generales del estado de Chihuahua.	15
3.5 Biodiversidad de mosquitos relacionados a ETV en Chihuahua.	17
3.6 Técnicas para la identificación de mosquitos.	23
3.6.1 Descripción morfológica y taxonómica del mosquito.....	23
3.6.2 El uso del DNA Barcode para la identificación molecular de especies.....	26
3.7 Patógenos de interés médico y veterinario asociados a ETV.	28
3.7.1 El Virus del Oeste del Nilo (VON) y su evolución en México.	30
3.7.1.1 Generalidades del VON	30
3.7.1.2 Estructura y linaje del VON.....	32
3.7.1.3 Importancia del VON en Mexico y E.U.A.	34
4. JUSTIFICACIÓN	35
5. OBJETIVOS	36



5.1 Objetivo general.....	36
5.2 Objetivos específicos.....	36
6. HIPÓTESIS.....	36
7. MATERIALES Y MÉTODOS.....	37
7.1 Área de estudio.....	37
7.2 Colecta de etapas inmaduras de mosquitos.....	38
7.3 Crianza de mosquitos en laboratorio.....	40
7.4 Identificación morfológica de mosquitos.....	41
7.5 Análisis molecular y bioinformático.....	43
7.5.1 Extracción y cuantificación de ADN para PCR y secuenciación.....	43
7.5.2 Análisis filogenético del Virus del Oeste del Nilo (VON) en México y la frontera Chihuahua – Estados Unidos.....	44
8. RESULTADOS.....	46
8.1 Número de mosquitos colectados y criados en laboratorio.....	46
8.2 Identificación morfológica de mosquitos.....	46
8.3 Análisis molecular: extracción, cuantificación.....	48
8.4 Análisis filogenético del Virus del Oeste del Nilo (VON) en México.....	49
8.4.1 Análisis de máxima parsimonia de taxones.....	50
8.4.2 Relaciones evolutivas de taxones – NJ/K2P.....	50
8.4.3 Relaciones evolutivas de taxones – NJ/p – distance.....	51
9. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES 9.1 Discusión.....	60
9.2 Conclusiones.....	63
10. RECOMENDACIONES Y PERSPECTIVAS.....	65
11. BIBLIOGRAFÍA.....	65

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Registros de mosquitos (diptera: culicidae) de la Colección de artrópodos de importancia médica (CAIM).	11
Figura 2. Ciclo de vida del mosquito.	13
Figura 3. Determinantes naturales de la competencia vectorial.....	15
Figura 6. Mapa de la localización de Chihuahua capital.	17
Figura 4. Diagrama de mosquito adulto hembra.	25
Figura 5. Árbol filogenético basado en las secuencias de nucleótidos completas de cepas seleccionadas del VON.	33
Figura 7. Mapa de panteones muestreados en la ciudad de Chihuahua.	37
Figura 8. Sitios de muestreo en panteones de la ciudad de Chihuahua.	39
Figura 9. Criador de mosquitos (mosquito breeder).....	41
Figura 10. Aspirador manual de mosquitos.....	41
Figura 11. Cámara letal de cloroformo.....	42
Figura 12. Identificación morfológica de los mosquitos.....	43
Figura 13. Proceso de los análisis bioinformáticos para el VON.....	45
Figura 14. Árbol filogenético de máxima parsimonia (MP) de cepas del WNV disponibles en México y la frontera Chihuahua - Estados Unidos.	55
Figura 15. Árbol filogenético de Neighbor Joining (NJ) y Kimura 2 parameters (K2P) de cepas del WNV disponibles en México y la frontera Chihuahua - Estados Unidos.	56
Figura 16. Árbol filogenético de Neighbor Joining (NJ) y p-distance de cepas del WNV disponibles en México y la frontera Chihuahua - Estados Unidos.	57



ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Principales vectores y enfermedades que transmiten	6
Tabla 2. Especies de mosquitos presentes en Chihuahua y su asociación con enfermedades transmitidas por mosquitos.	19
Tabla 3. Mosquitos colectados y criados en cementerios de la ciudad de Chihuahua	46
Tabla 4. Identificación y distribución de especies de mosquitos.	47
Tabla 5. Cuantificación del ADN total.	48
Tabla 6. Secuencias completas y parciales del VON disponibles en GenBank para México.	52
Tabla 7. Estimaciones de divergencia evolutiva entre las secuencias del VON.....	58
Tabla 8. Estimaciones de divergencia evolutiva promedio en todos los pares de secuencias.....	59



LISTA DE ABREVIATURAS.

ETV – Enfermedades transmitidas por vector.

PCR – Reacción en cadena de la polimerasa.

ADN – Ácido desoxirribonucleico.

OMS – Organización Mundial de la Salud.

DENV – Virus del dengue .

ZIKV – Virus del Zika.

CHIKV – Virus del chikungunya

VON – Virus del Nilo occidental.

SSA – Secretaría de Salud.

SINAVE - Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica.

InDRE - Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos.

CENAPRECE - Centro Nacional de Programas Preventivos y Control de Enfermedades.

DGE – Dirección General de Epidemiología.

INEGI – Instituto Nacional de Estadística y Geografía.

SE – Secretaría de Economía.

FMMR – Fiebre Manchada de las Montañas Rocosas.

CAIM – Colección de Artrópodos de Interés Médico.

LF – Filariasis linfática.

COI – Citocromo C Oxidasa Subunidad I.

gr – Gramo.

L – Litro.

h – horas.

E.U.A. – Estados Unidos de América

1. RESUMEN

Los mosquitos son insectos dípteros que se distribuyen globalmente. Se les considera los principales vectores de patógenos que causan millones de muertes cada año. Las enfermedades transmitidas por mosquitos representan un importante problema de salud pública en México. Los cementerios son áreas críticas para el desarrollo de mosquitos y, por lo tanto, para la distribución de patógenos. El objetivo de esta investigación es obtener un registro actualizado de la biodiversidad de especies de mosquitos en los cementerios de la ciudad de Chihuahua. En este estudio se recolectaron larvas de mosquito de cuatro cementerios ubicados en la ciudad, durante el período de agosto - octubre del 2019. La colecta fue mediante pipeteo manual y posteriormente se criaron en el laboratorio hasta la eclosión del adulto. Los adultos se identificaron mediante claves taxonómicas y técnicas moleculares. Se colectaron un total de 3,250 larvas, emergiendo 741 adultos de estas. También, se recolectaron 16 adultos de los cementerios. Se identificaron dos géneros importantes, *Aedes* y *Culex*; dentro de estos géneros se identificaron 6 especies diferentes: *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus 1762), *Culex (Culex) quinquefasciatus* (Say, 1823), *Culex (Culex) restuans* (Theobald, 1901), *Culex (Culex) stigmatosoma* (Dyar, 1907), *Culex (Culex) tarsalis* (Coquillett, 1896) y *Culex (Neoculex) territans* (Walker, 1856). Los resultados de este estudio sugieren que las especies de mosquitos que se encuentran presentes en los cementerios representa una señal de alerta importante, ya que estas especies están relacionadas con la transmisión de diversos patógenos, principalmente arbovirus. La población que reside cerca de estas áreas podrían estar expuestas a estas enfermedades transmitidas por mosquitos y representan un importante problema de salud pública. Los datos podrían usarse para desarrollar medidas de control y prevención pertinentes para abordar estas infecciones transmitidas por mosquitos; así como también, abre la puerta a nuevas investigaciones sobre éstos artrópodos, particularmente en el campo de la entomología médica y veterinaria, que pueden ayudar a prevenir este problema de salud pública en esta zona de México.

1.1 ABSTRACT

Mosquitoes are dipterous insects that are globally distributed. They are considered the main vectors of pathogens, that causes millions of deaths every year. Mosquito-borne diseases represent an important public health problem in Mexico. Cemeteries are critical areas for mosquito development and therefore for the distribution of pathogens. The aim of this investigation is to get an updated register of mosquito species associated with vector-borne diseases in cemeteries at Chihuahua city in northern México. Mosquito larvae were collected from four cemeteries located in the city, during the period from August-October of 2019. They were taken by manual pipetting and artificially reared in the laboratory until obtaining the adult. The reared adults were identified using taxonomic keys and molecular techniques. A total of 3,250 larvae were sampled, 741 adults emerged, and 16 adults were collected in the field. Two important genera were identified, *Aedes* and *Culex*; within these genera, 6 different species were identified: *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus 1762), *Culex (Culex) quinquefasciatus* (Say, 1823), *Culex (Culex) restuans* (Theobald, 1901), *Culex (Culex) stigmatosoma* (Dyar, 1907), *Culex (Culex) tarsalis* (Coquillett, 1896), and *Culex (Neoculex) territans* (Walker, 1856). The results of this study suggest that the mosquito species population that are present in cemeteries represents an important warning sign because this species is related to the transmission of diverse pathogens, principally arboviruses. The inhabitants near of these areas could be exposed to these mosquito-borne diseases and represent an important public health problem. The data could be used to develop control and prevention measures for these infectious diseases and also opens the door to new research on mosquitoes particularly in the field of medical and veterinary entomology, that may help to prevent this public health problem in this region of Mexico.



2. INTRODUCCIÓN

Los mosquitos son insectos pertenecientes al orden Diptera, que se clasifican como nematóceros colocados dentro de la familia Culicidae, y que se divide en la subfamilia Culicinae y Anophelinae (Knight y Stone, 1977). Hay alrededor de 3,490 a 3,601 morfoespecies actualmente reconocidas a nivel mundial, y 15 de ellas están reconocidas como registros fósiles (Harbach, 2007; Wilkerson et al., 2015). De los 44 géneros aceptados, solo *Toxorhynchites* no posee hábitos hematófagos, mientras que el resto se alimentan de sangre (solo las hembras) y se consideran vectores importantes de patógenos de salud pública (Takken y Verhulst, 2013).

Las enfermedades transmitidas por vector (ETV) son ocasionadas por patógenos transmitidos por diversos artrópodos, principalmente mosquitos, estas representan el 17% de las enfermedades infecciosas a nivel mundial según con datos proporcionados por la Organización Mundial de la Salud (OMS, 2017). A través de la historia han ocasionado morbilidades y mortalidades significativas. Anualmente causan aproximadamente 700,000 muertes y discapacidad en cierto porcentaje de la población (OMS, 2017). Los mosquitos son los principales y más importantes vectores de enfermedades por arbovirus como el DENV, el ZIKV, el CHIKV, el YFV, el VON, el VEEV, entre otras, que afectan a humanos y animales (Service, 2012). También, enfermedades como la malaria o el dengue afectan a la mayoría de los países, sobre todo los sub-desarrollados, siendo millones la cifra global de infectados y miles de defunciones por año (OMS, 2017).

De acuerdo con la OMS, México es vulnerable para estas enfermedades antropozoonóticas; el territorio cuenta con factores ambientales y socioeconómicos óptimos para la transmisión enfermedades a través de artrópodos vectores. Se estima que en México alrededor de 50 millones de personas que viven en áreas urbanas y rurales que se encuentran en riesgo de adquirirlas (Centro Nacional de Programas Preventivos y Control de Enfermedades (CENAPRECE), 2017).



En el estado de Chihuahua, se ha reportado la presencia de varios arbovirus como el virus del dengue (DENV) (Mora-Covarrubias et al., 2010), el virus del zika (ZIKV) (Correa-Morales et al., 2019) y el virus del oeste del nilo (VON) (Estrada-Franco et al., 2003).

Las carecterísticas medioambientales de determinadas regiones de la entidad favorecen el crecimiento y desarrollo de los vectores, sobre todo en temporada de lluvias, ya que parte del ciclo de vida del mosquito se desarrolla en ambientes acuáticos (Crans, 2004). Es importante señalar que la presencia de aves migratorias y otros animales pueden actuar como reservorios de diversos patógenos tales como el VON (Kuno et al., 2017; Rappole et al., 2000). También las actividades socioeconómicas como la ganadería, la agricultura, el turismo, entre otras; son un factor importante, sobre todo en la distribución de los vectores y los patógenos (Gratz, 1999; Mayer et al., 2017). Así mismo, también influyen los factores sociodemográficos, tales como las condiciones de las viviendas y el saneamiento, la salud, la educación y el trabajo de los individuos (Ernst et al., 2009; Vannavong et al., 2017).

La lista de factores que pueden promover la transmisión de patógenos a los humanos y animales es amplia. Sin embargo, debido a que es un área poco estudiada en Chihuahua y no se cuenta con información actualizada a la fecha, el presente estudio proporciona un registro actualizado sobre la biodiversidad de especies de mosquitos asociados a enfermedades transmitidas por vector (ETV) en la ciudad de Chihuahua, particularmente en cementerios. Estos sitios se consideran áreas críticas para el desarrollo de mosquitos, esto debido a que poseen fuentes de alimento, refugio y una alta disponibilidad de hábitats de reproducción tales como floreros u otros recipientes; lo cual, puede influir directamente en la distribución de patógenos. Los resultados que se presentan en esta tesis se obtuvieron como parte de un estudio multidisciplinario realizado en el periodo abril – diciembre de 2019 en la entidad.

3. ANTECEDENTES

3.1 Enfermedades transmitidas por vector.

Las enfermedades transmitidas por vector (ETV) son enfermedades causadas por patógenos de etiología diversa (bacterias, parásitos, virus) y afectan tanto a humanos como a animales (OMS, 2017). Son transmitidos por organismos vivos, generalmente artrópodos hematófagos a los que se les conoce como vectores (Beard et al., 2016). Se consideran vectores a todos aquellos organismos en los cuales tiene lugar alguna fase esencial del ciclo de vida del agente patógeno y son capaces de transmitirlo de forma activa al hombre y los animales, ya sea por picadura, mordedura o a través de fluidos corporales (Wilson et al., 2017).

A nivel mundial las ETV representan un grave problema de salud pública, se estima que más del 17% de las enfermedades infecciosas son a causa de las ETV. En 2017 la OMS señaló que alrededor de 700,000 personas mueren anualmente a causa de las ETV; 3,900 millones están en riesgo de contraer dengue y que aproximadamente 400,000 más mueren a causa de la malaria/paludismo (OMS, 2017). Gran porcentaje de la población es afectada y se encuentra expuesta a alguna enfermedad transmitida por vector como la enfermedad de Chagas, leishmaniasis, esquistosomiasis, entre otras (OMS, 2017).

Existen una gran variedad de artrópodos que pueden actuar como vectores, los principales en interés médico a nivel mundial son los mosquitos, seguidos por las garrapatas. Estas últimas son consideradas las primeras en importancia veterinaria, seguidas de los mosquitos. Otros vectores de interés en ETV son las moscas tse-tsé, moscas negras (simúlidos), chinches (triatominos), pulgas, piojos, flebótomos; además, ciertas especies de caracoles acuáticos pueden actuar como intermediarios (Tabla 1).

Tabla 1. Principales vectores y enfermedades que transmiten

Vectores	Géneros	Enfermedades transmitidas
Mosquitos (Culicidae)	<i>Anopheles</i> spp.	Malaria/paludismo, filariasis linfática
	<i>Aedes</i> spp.	Chikungunya, fiebre del Dengue, filariasis linfática, fiebre de Rift Valley, fiebre amarilla, Zika
	<i>Culex</i> spp.	Encefalitis japonesa, filariasis linfática, fiebre del Nilo occidental
Garrapatas (Ixodidae)	<i>Ixodes</i> spp., <i>Dermacentor</i> spp., <i>Rhipicephalus</i> spp., <i>Argas</i> spp., <i>Ornithodoros</i> spp.	Fiebre hemorrágica de Crimea-Congo, enfermedad de Lyme, fiebre recurrente (borreliosis), enfermedades rickettsiales (FMMR and fiebre Q), encefalitis transmitida por garrapatas, Tularemia
Moscas de la Arena (Phlebotomidae/Psychodidae)	<i>Phlebotomus</i> sp. <i>Lutzomyia</i> sp.	Leishmaniasis, fiebre Pappataci
Triatominos (Reduviidae)	<i>Triatoma</i> sp.	Enfermedad de Chagas (Tripanosomiasis americana)
MoscaTsé-Tsé (Glossinidae)	<i>Glossina</i> sp.	Enfermedad del sueño (Tripanosomiasis africana)
Pulgas (Pulicidae)	<i>Pulex irritans</i> <i>Ctenocephalides felis</i> <i>Xenopsylla cheopis</i>	La peste (<i>Yersinia pestis</i>) transmitida por pulgas de ratas a los humanos, Rickettsiosis
Mosca negra (Simuliidae)	<i>Simulium</i> spp.	Oncocercosis (ceguera de los ríos)
Piojos (Phthiraptera)	<i>Phthirus pubis</i> <i>Pediculus humanus</i>	Tifus y fiebre recurrente transmitida por piojos
Caracóles acuáticos (Planorbidae)	<i>Biomphalaria</i> spp. <i>Bulinus</i> spp.	Schistosomiasis (bilharziasis)

Adaptado de la hoja informativa de la OMS: Enfermedades transmitidas por vectores (OMS, 2017)



La distribución de las ETV está estrechamente determinada por diversos factores medioambientales y socioeconómicos. El turismo y el comercio internacional, la urbanización desmedida y los diferentes desafíos medioambientales, como el cambio climático, pueden afectar de manera directa e indirecta la exposición y transmisión de patógenos, hacer que la temporada de transmisión sea más larga o más intensa o causar enfermedades en países donde antes no se tenían registros (Sutherst, 2004).

Otros factores que influyen son los cambios en las prácticas agrícolas debido a los cambios de la temperatura y las precipitaciones pueden afectar en la exposición y la transmisión de enfermedades transmitidas por vectores. El crecimiento poblacional y urbanístico, propicia la carencia de agua potable confiable, el manejo inadecuado de los desechos sólidos, pueden hacer que grandes poblaciones en pueblos y ciudades estén en riesgo de contraer alguna enfermedad viral transmitida por los mosquitos (Leishnam y Juliano, 2012). Todos los factores mencionados influyen en el alcance de las poblaciones de vectores y los patrones de transmisión de patógenos causantes de enfermedades (Beard et al., 2016; OMS, 2017). Las ETV están presentes en más de 100 países en todo el mundo, predominantemente en países en desarrollo en los trópicos y aunque existen medidas de control y prevención de estas enfermedades los casos de incidencia, morbilidad y mortalidad van en aumento (McGraw y O'Neill, 2013).

3.2 ETV en México.

Actualmente en México, las ETV representan un importante problema de salud pública. Se estima que, en las zonas de desarrollo económico importante, tales como centros agrícolas, ganaderos, industriales, pesqueros, petroleros y turísticos se poseen factores medioambientales y socioeconómicos que favorecen la distribución de vectores y posteriormente aumenta el riesgo de transmisiones de ETV. Es decir, alrededor del 60% del territorio nacional cuenta con estas características, lo que conlleva a que cerca de 50 millones de habitantes de zonas urbanas y rurales, se encuentren en riesgo de padecer alguna ETV (CENAPRECE, 2017).



El territorio mexicano posee una superficie de 1,958,200 km². La mayor parte del país es una inmensa meseta elevada y se encuentra rodeada por sistemas montañosos importantes. Las dos cadenas montañosas son las Sierras Madre Oriental y Occidental. El rasgo topográfico más notable es la meseta central, la cual comprende más de la mitad de la superficie del país (INEGI, 2013). Las variaciones climáticas son debido a que México se encuentra dividido en dos partes por el trópico de cáncer, pero en general el clima varía en relación a las diversas altitudes. A lo largo de la República Mexicana, existen territorios que poseen características medioambientales y factores socioeconómicos, donde los problemas de las ETV implican un gran desafío para el sistema de salud del país. Esto debido a que generalmente los habitantes de estas zonas conforman una sociedad diversa, con problemas de equidad y desigualdad, tanto económica, como cultural (Rodríguez-Domínguez, 2002).

El boletín epidemiológico, es el medio oficial de difusión de la morbilidad del Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica (SINAVE) y representa una de las principales herramientas epidemiológicas proporcionadas por la Dirección General de Epidemiología (DGE). Su función es difundir los casos nuevos de los padecimientos sujetos a vigilancia cada semana por sexo, grupo de edad y entidad federativa (SSA, 2019). En la sección de ETV en México, se reportaron a la semana 53 del año 2020; 19,172 casos de dengue no grave, 4,083 casos de dengue con signos de alarma, 1,058 casos de dengue grave, 7 casos de Chikungunya, 20 casos de Zika y 345 casos de paludismo causados por *Plasmodium vivax* (DGE, 2020).

En México, en un panorama a futuro, es muy probable que ciertos factores clave se combinen, tales como: el incremento de temperatura y humedad, mayores precipitaciones en zonas costeras y en el sureste del país; propiciando así, un cambio ecológico considerable. Debido a lo anterior, los patrones de distribución de vectores experimentarían una alteración importante, sobre todo en aquellas regiones cálidas y semicálidas que son áreas potencialmente endémicas (Aguilar, 2006; Arredondo-García et al., 2020).



No obstante, estas ETV se han vuelto en la actualidad un problema de salud pública importante en determinadas regiones del país, por ejemplo, se han reportado 5 brotes importantes de dengue durante el periodo 2010 – 2019 en México, en los años 2007, 2009, 2012, 2013 y el más reciente en 2019; con más de 518,000 casos confirmados en varios estados de la república, tales como: Veracruz, Oaxaca, Guerrero, Quintana Roo, Nuevo León, Nayarit, Jalisco, Colima, Yucatán, Morelos, Chiapas, Tabasco, Tamaulipas y Baja California Sur (Arredondo-García et al., 2020).

En estudios previos, se hace énfasis en factores como el cambio climático global, el cuál es permanente y ocurre a una velocidad dramática (Nacional Academia de Ciencias, 2016). Se debe controlar y revertir los cambios demográficos y urbanísticos, así como también, realizar cambios en las prácticas agrícolas como el uso de suelos, vegetación, especies; disminuir las emisiones de CO₂ para retardar el desgaste de la capa de ozono, el calentamiento de la tierra y el inminente deshielo de los casquetes polares, ya que son de las mayores preocupaciones a nivel mundial (Mayer et al., 2017). Otro punto importante que se aborda es el control y la prevención de enfermedades emergentes/reemergentes transmitidas por vectores, lo cual representa un desafío mayor, pero sólo de esa manera se podría tener éxito contra los problemas de las ETV en la actualidad y en un futuro (Gratz, 1999; D J Gubler, 1998; Sutherst, 2004).

3.3 Mosquitos (Diptera: Culicidae).

Los mosquitos son insectos de dos alas pertenecientes al orden Diptera, familia Culicidae. Son un grupo bastante amplio y el más conocido por su importancia en salud pública, ya que pueden actuar como vectores de diversas enfermedades que afectan a animales y humanos. Son cosmopolitas, alcanzando su mayor diversidad en las selvas tropicales y probablemente su mayor abundancia en las regiones árticas y antárticas después del deshielo de la primavera y principios del verano (Carpenter y La Casse, 1955).

La familia Culicidae incluye 3,539 especies agrupadas en la subfamilia Anophelinae y Culicinae, de los cuales se clasifican 112 géneros. La subfamilia de Anophelinae está compuesta por hasta tres géneros, mientras que la subfamilia Culicinae tiene 109 géneros segregados en 11 tribus (Harbach, 2007). Dentro de la primera subfamilia tenemos al género *Anopheles*, el cuál es el vector del protozooario causante de la malaria/paludismo. Por parte, en la subfamilia Culicinae, se encuentra el género *Aedes*, el cuál es transmisor de diversos arbovirus como el DENV, YFV, ZIKV, CHIKV, entre otros, igualmente es vector de malaria aviar y filariasis en humanos y animales. Otro género importante de esta subfamilia es *Culex*, los cuáles son transmisores de otros arbovirus causantes de enfermedades como el: VON, JEV, VEEV, SLEV; así como también, enfermedades parasitarias como las filariasis linfáticas ocasionadas por nemátodos de diferentes especies (*Wuchereria bancrofti*, *Brugia malayi*, *Loa loa*, *Manzonella* spp., *Dirofilaria immitis*) (OMS, 2017).

En México, de acuerdo con la Colección de Artrópodos con importancia Médica (CAIM) del Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos (InDRE), a través de la plataforma de Global Biodiversity Information Facility (GBIF), se estiman aproximadamente 36,668 registros de mosquitos de la familia Culicidae (Figura 1). En el reporte predomina el género *Culex* con 11,849 registros (32.3%), seguido de *Aedes* con 9,906 (27%) y posteriormente el género *Anopheles* con 6,175 (16.7%), el restante corresponde a otros géneros de mosquitos (Jiménez, 2018).

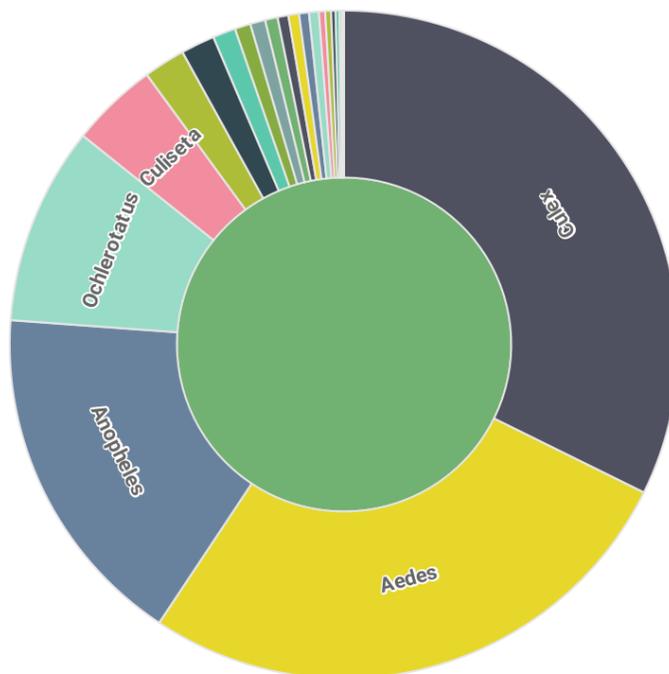


Figura 1. Registros de mosquitos (Diptera: Culicidae) de la Colección de artrópodos de importancia médica (CAIM). Predominancia de los géneros *Culex*, *Aedes* y *Anopheles*, abarcando aproximadamente 75% de los registros en México (Jiménez, 2018).

3.3.1 Ciclo de vida.

Durante su vida los mosquitos atraviesan cuatro etapas sucesivas en su desarrollo: huevo, larva, pupa y adulto (Figura 2) (Carpenter y La Casse, 1955). Las etapas inmaduras de los mosquitos ocupan un espectro de ambientes acuáticos. El adulto es un insecto volador. Después de alimentarse con sangre, el mosquito hembra pone los huevos directamente sobre o cerca del agua, el suelo y en la base de plantas, de preferencia en lugares que pueden llenarse de agua.

Los huevos pueden sobrevivir en condiciones secas durante unos meses dependiendo la especie. Por ejemplo, los huevos de *Aedes aegypti* resisten más tiempo en condiciones más altas de temperatura y climas secos, lo que favorece su supervivencia y le da ventajas sobre otras especies de mosquitos (Juliano et al., 2002).

Los huevos eclosionan en el agua y emerge la etapa inmadura del mosquito, la larva o también denominados coloquialmente como "maromeros". El tiempo de eclosión depende de la temperatura del agua, la humedad relativa y la especie de mosquito. La larva vive en el agua, se alimentan de algas, plancton, hongos y bacterias y otros microorganismos (Crans, 2004). La fase larvaria se desarrolla en cuatro estadios denominados "instar", que van desde el instar 1 hasta el instar 4. Posteriormente, se transforma a pupa. Esta última también vive en el agua, pero ya no se alimenta, solamente se coloca cerca de la superficie del agua para respirar mediante estructuras denominadas trompetas respiratorias. Finalmente, el mosquito emerge de la pupa después de un periodo de dos días a una semana aproximadamente. El ciclo de vida suele durar dos semanas, pero dependiendo de factores medioambientales y disponibilidad de alimento, puede variar de 4 días a un mes. El mosquito adulto emerge a la superficie del agua y vuela, listo para comenzar su ciclo de vida.

La distribución de las especies depende en gran medida de las preferencias de alimentación. Todos los mosquitos machos y hembras se alimentan principalmente de néctares y azúcares de plantas, para la obtención de nutrientes. Cabe destacar que sólo la hembra pica y se alimenta de la sangre de humanos y otros animales, debido a que la alimentación con sangre activa la etapa vitelogénica de la ovogénesis, es decir el desarrollo y maduración de los huevos (Valzania et al., 2019). La mayoría de las especies de mosquitos se alimentan de la sangre de animales vivos, sin embargo, especies de los géneros *Toxorhynchites*, *Topomyia* y *Malaya*, no poseen hábitos de hematofagia. Estas especies, pueden producir huevos sin ingerir sangre, al poseer un primer grupo de huevos de manera autógena (Gulia-Nuss et al., 2015).

Además, se ha demostrado que en especies como *A. taeniorhynchus*, ese primer grupo de huevos se encuentra presente, sin embargo, necesitan la ingestión de sangre para continuar produciendo huevos, a estas especies se les denomina autógenas facultativas (O'Meara y Edman, 1975). Conocer las diferentes etapas del ciclo de vida del mosquito puede contribuir al control y prevención de enfermedades (Crans, 2004; US EPA, 2017).

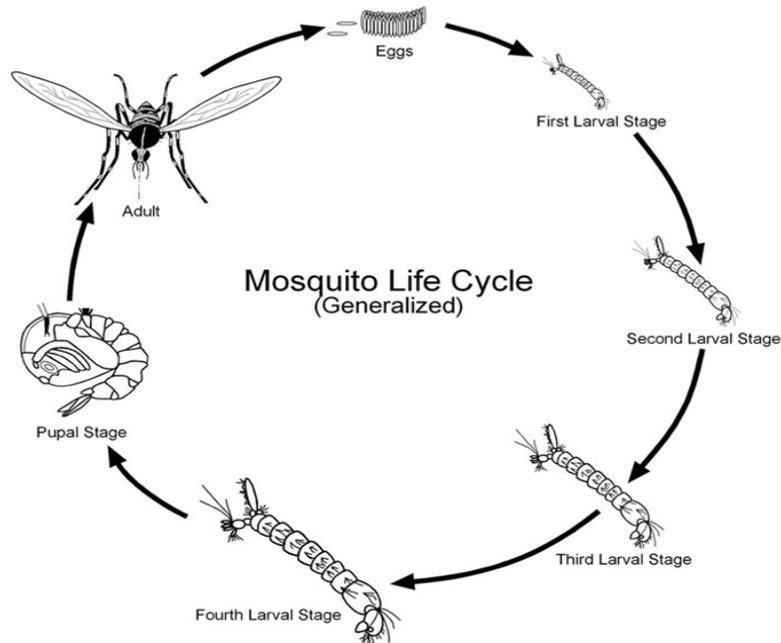


Figura 2. Ciclo de vida del mosquito. Ilustración por: Scott Charlesworth, Purdue University. Fuente: <http://extension.entm.purdue.edu/publichealth/insects/mosquito.html>

3.3.2 Cementerios: potenciales criaderos de mosquitos.

Los cementerios son un componente esencial en los asentamientos humanos, tanto en áreas rurales como urbanas. En México y la mayor parte de Latinoamérica, son una parte fundamental de la cultura, pues en estos lugares se honra la memoria de los difuntos, especialmente en celebraciones importantes como el Día de Muertos, en México, que es atendido por un gran número de personas (Orduño-Servín, 2014).

Son considerados como áreas críticas para el desarrollo de mosquitos y a menudo están ubicados en áreas altamente urbanizadas que sirven como refugio para poblaciones de especies de mosquitos con alto potencial de vector. Lo anterior debido a que estos sitios poseen diversos recursos naturales que son fuente de alimentación para los mosquitos, tales como: néctares de plantas, el jugo de frutas, la melaza, entre otros jugos con alto contenido de carbohidratos, su principal suministro de energía (Vezzani, 2007).

Por otro lado, los cementerios también ofrecen zonas de refugio y reposo para los mosquitos adultos, así como también, una alta disponibilidad de hábitats de reproducción tales como floreros u otros recipientes los cuales puedan albergar agua. Pero lo más importante de estos sitios, es la presencia de hospederos (animales y humanos), debido a que las hembras se alimentan de su sangre para llevar a cabo la ovogénesis y así reproducirse (Dávalos-Becerril et al., 2019; Fryxell et al., 2015; Garcia-Rejon et al., 2018; Vezzani, 2007; Vezzani et al., 2001).

Se han identificado especies importantes en estos sitios; los estadios inmaduros de *Culex quinquefasciatus* y *Aedes aegypti* son muy comunes en estos lugares (Vezzani y Albicocco, 2009). En algunos estudios, se han utilizado estos sitios para la detección y seguimiento de especies invasoras de mosquitos como *Aedes albopictus*, evaluando métodos de control de mosquitos y estudiando la ecología de los mosquitos (Garcia-Rejon et al., 2018; Leishnam, 2009; Nyamah et al., 2011; O'Meara et al., 1992; Vezzani, 2007; Vezzani et al., 2001).

3.3.3 Competencia vectorial de patógenos.

Existen varios factores que determinan la capacidad de un mosquito para transmitir patógenos que causan enfermedades (Figura 3). Uno de los principales factores es que un mosquito debe ser un vector competente. El término de "competencia vectorial" se refiere a la capacidad de un mosquito de adquirir un agente patógeno de un reservorio y posteriormente transmitirlo a un hospedero susceptible durante su alimentación de sangre (Azar y Weaver, 2019).

Esto depende de que el mosquito posea características basadas en factores ambientales, conductuales, celulares y bioquímicos para ser un hospedero adecuado en el cual, el patógeno sobreviva, experimente un desarrollo esencial (parte de su ciclo de vida) , se multiplique y eventualmente migre a las glándulas salivales. Cabe destacar que la transmisión de los agentes patógenos ocurre por inyección de secreciones salivales durante el acto de alimentación (Beerntsen et al., 2000; Souza-Neto et al., 2019).

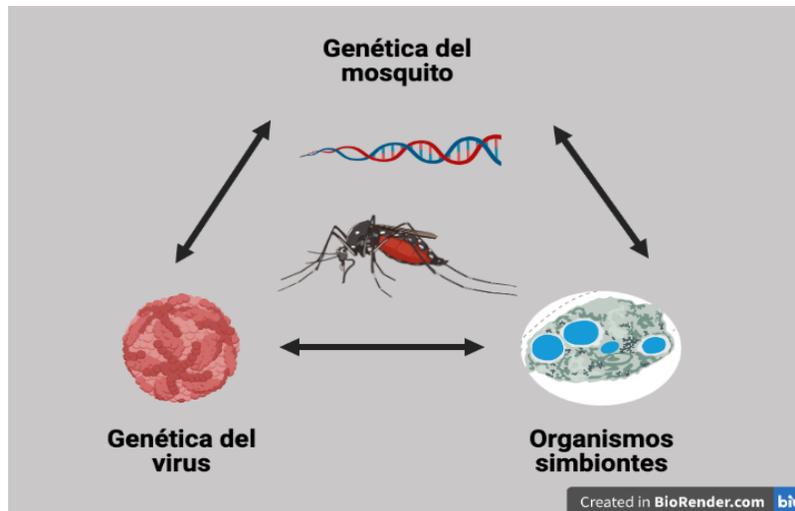


Figura 3. Determinantes naturales de la competencia vectorial. Adaptado de “*Aedes aegypti* vector competence studies: A review”. Creado en BioRender.com. Los elementos genéticos y ambientales pueden favorecer la competencia del vector. Sin embargo, se necesita un panorama más amplio acerca de los procesos evolutivos de los vectores, arbovirus y simbiotes, como de su interacción (Souza-Neto et al., 2019).

3.4 Aspectos generales del estado de Chihuahua.

Chihuahua se localiza en la parte central del norte del país. Se encuentra ubicado en las coordenadas norte $31^{\circ}47'04''$, al sur $25^{\circ}33'32''$ de latitud norte; al este $103^{\circ}18'24''$, al oeste $109^{\circ}04'30''$ de longitud oeste. Es el estado más grande de la República Mexicana, abarca una superficie de $247,455 \text{ km}^2$ que representa alrededor del 12.5% del territorio nacional. Colinda al norte y al este con los EUA; también al este con Coahuila de Zaragoza y Durango; al sur con Durango y Sinaloa; al oeste con Sinaloa, Sonora y los EUA (INEGI, 2018).

Posee una gran diversidad de vegetación que incluye bosques, selva, pastizales, matorrales y otros, siendo los matorrales los que mayor extensión estatal poseen ya que representa el 32% de esta. A lo largo del estado predominan los climas secos ya que abarcan el 40% de la superficie del territorio. Estos se distribuyen principalmente en la zona noreste del estado y en menor proporción, en el sureste (INEGI, 2019).

Los climas templados en el estado se distribuyen al sureste coincidiendo en territorio con la Sierra Madre Occidental; estos abarcan el 12.87% de la superficie del estado. También se presentan climas templados semifríos con verano fresco largo subhúmedo. Los climas cálidos presentes en el estado se localizan al sureste en la zona colindante con los estados de Sonora y Sinaloa. Cabe destacar que estos últimos son factores clave para el desarrollo de vectores como mosquitos, ya que poseen las características medioambientales óptimas para su crecimiento y distribución (Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI), 2019).

Entre las principales actividades socioeconómicas del estado se encuentran: comercio (15.5%); servicios inmobiliarios y de alquiler de bienes muebles e intangibles (14.7%); fabricación de maquinaria y equipo (11.2%); construcción (7.6%); y, agricultura, cría y explotación de animales, aprovechamiento forestal, pesca y caza (6.9%). Dichas actividades socioeconómicas representan el 55.9% del PIB estatal (Secretaría de Economía (SE), 2018).

3.4.1 Ciudad de Chihuahua.

La ciudad de Chihuahua, Chihuahua, al norte de México (Figura 5). El municipio de Chihuahua se encuentra localizado justo en el centro del estado en las coordenadas geográficas: latitud: 28.6353, longitud: -106.089 28° 38' 7" Norte, 106° 5' 20" Oeste. La ciudad posee una altitud de 1,437 metros sobre el nivel del mar. Alrededor de la ciudad de Chihuahua, se ubican nueve municipios; al norte colinda con Buenaventura y Ahumada; al este con Aldama, Aquiles Serdán y Rosales; al sur con Rosales, Satevó y Belisario Domínguez; y al oeste con Riva Palacio, Namiquipa y Santa Isabel (Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI), 2018).

El clima de la ciudad pertenece al semiárido, con variantes como seco templado seco, seco cálido seco y seco templado y semifrío. La temperatura media anual es de 18.2° C con media máxima de 37.7° C y media mínima de -7.4° C.

La media anual de precipitación pluvial es de 387.5 mm. Hay 71 días de lluvias al año aproximadamente, con una humedad relativa de 49% (Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI), 2018).



Figura 4. Mapa de la localización de Chihuahua capital. En color verde se muestra el municipio de Chihuahua, Chihuahua; cuenta con una superficie de 8,384.37 km², que representan el 3.73% de la extensión total de la entidad.

3.5 Biodiversidad de mosquitos relacionados a ETV en Chihuahua.

Se han identificado un total de 25 especies de mosquitos para Chihuahua. La mayoría de estas especies están asociadas con patógenos transmisibles que pueden infectar a los vertebrados, incluidos los humanos (Heinemann et al., 1977; Martini, 1935; Ortega-Morales & Nava, 2020; Sudia et al., 1975; L Vargas, 1941; Luis. Vargas & Martínez Palacios, 1956; Luis Vargas, 1956). En la siguiente tabla, se muestran las especies de mosquitos que se han registrado a través de los años en Chihuahua, así como también, su relación con patógenos detectados en dichas especies en otras partes del mundo (Tabla 2). Existen al menos seis registros relacionados con enfermedades transmitidas por mosquitos en Chihuahua. Estos estudios han informado sobre los vectores y patógenos de los mosquitos que causan estas enfermedades, basándose en la identificación molecular e inmunológica (De la Mora Covarrubias y Olivas, 2007; Estrada-Franco et al., 2003; Huerta et al., 2017; Mann et al., 2013; Palermo et al., 2019a; Sudia et al., 1975).



El registro más antiguo es de 1972, durante la epidemia de encefalitis equina venezolana (VEEV) en México, mismo que fue publicado tres años después. En este trabajo se realizaron estudios de vectores de virus en Durango, Chihuahua y Tamaulipas, en junio y julio de 1972. Se muestrearon los municipios de Chihuahua, San Diego y Julimes en busca de mosquitos. *Aedes vexans*, *Aedes angustivittatus* y *Culex tarsalis* fueron las especies más comunes recolectadas, entre otras. La epidemia de VEEV infectaba naturalmente a los mosquitos. El virus Flanders y el WEEV se aislaron de mosquitos colectados en Julimes y San Diego de Alcalá, ambos de *Cx. tarsalis* (Sudia et al., 1975).

En 2003, se identificó la presencia de anticuerpos contra el VON en el suero de caballos de varios estados y municipios de la República Mexicana. En Chihuahua, fueron detectados en un caballo en el municipio de Ojinaga (Estrada-Franco et al., 2003). En 2010 se realizó un análisis de distribución geoespacial y detección de DENV en mosquitos *Aedes aegypti* en Ciudad Juárez (CJS), Chihuahua, donde 24 muestras positivas de 42 detectaron serotipos DENV-2 y DENV-3 (Mora-Covarrubias et al., 2010). En 2013, un estudio indicó una circulación dinámica en la transmisión del VNO entre la frontera de EUA y México, específicamente entre El Paso, Texas (ELP) y CJS, Chihuahua. En este estudio se aislaron varias cepas de virus de mosquitos del género *Culex*, como *Cx. quinquefasciatus* (CJS y ELP) y *Cx. tarsalis* (ELP) (Mann et al., 2013). En 2019, el ZIKV se identificó de forma natural en mosquitos *A. aegypti*, *Cx. quinquefasciatus*, *Cx. tarsalis* y *Cx. Erraticus*. Sin embargo, no se registraron casos de la enfermedad en el estado de Chihuahua (Correa-Morales et al., 2019). Ese mismo año se publicó un estudio de 2015, donde la evidencia serológica mostró infecciones por DENV y VON en humanos en CJS, Chihuahua (Palermo et al., 2019b).

Tabla 2. Especies de mosquitos presentes en Chihuahua y su asociación con enfermedades transmitidas por mosquitos.

Especies de mosquitos	Sitio de colecta	Reportado por	Patógenos detectados en mosquitos en otras partes del mundo
<i>Aedes (Stegomyia) aegypti</i> (Linnaeus 1762)	CUU	Ibáñez y Martínez-Campos 1994, Ortega-Morales et al. 2019	CHIKV, DENV, ORUV, VEEV, WNV, YFV, ZIKV (Ali et al., 2017; CDC, 2016; Wilkerson et al., 2015)
<i>Aedes (Ochlerotatus)</i> <i>angustivittatus</i> (Dyar & Knab 1908)	CUU	Sudia et al. 1975	ILHV (De Rodaniche et al.1963), VEEV (Sudia et al., 1975)
<i>Aedes (Ochlerotatus)</i> <i>canadensis</i> (Theobald 1901)	CUU	Ortega-Morales et al. 2020	EEEV (Armstrong et al. 2010), HJV (Andreadis et al., 1998), JCV (Andreadis et al., 1994), RVFV (Gargan et al., 1988), WNV (CDC, 2016)
<i>Aedes (Ochlerotatus) dorsalis</i> (Meigen, 1830)	CUU	Ortega-Morales et al. 2020	WEEV (Carpenter et al. 1955), WNV(CDC, 2016), Banna (Liu et al., 2010), Liaoning (Tao et al., 2003)
<i>Aedes (Ochlerotatus) epactius</i> (Dyar & Knab 1908)	CUU	Ibáñez y Martínez-Campos 1994	WNV (CDC, 2016)
<i>Aedes (Ochlerotatus) mitchellae</i> (Dyar, 1905)	CUU	Ortega-Morales et al. 2020	EEEV, TENV (Duguma et al., 2020; Wilkerson et al., 2015)
<i>Aedes (Ochlerotatus) sollicitans</i> (Walker, 1856)	CUU	Ortega-Morales et al. 2020	CVV (Andreadis et al., 2014), EEEV (Wilkerson et al., 2015), RVFV (Gargan et al., 1988), VEEV (Wilkerson et al., 2015), WNV (CDC, 2016)
<i>Aedes (Ochlerotatus) sticticus</i> (Meigen, 1938)	CUU	Ortega-Morales et al. 2020	EEEV, JCV, TAHV, WNV (CDC, 2016; Duguma et al., 2020; Wilkerson et al., 2015)



<i>Aedes (Ochlerotatus) thelcter</i> (Dyar, 1918)	CUU	Ortega-Morales et al. 2020	VEEV (Wilkerson et al., 2015)
<i>Aedes (Protomacleaya) triseriatus</i> (Say, 1823)	CUU	Ortega-Morales et al. 2019, Ortega-Morales et al. 2020	CVV (Mitchell et al., 1998), EEEV (Armstrong et al. 2010), JCV (Wilkerson et al., 2015), LACV (Wilkerson et al., 2015), RVFV (Gargan et al., 1988), WEEV (Ortega-Morales et al., 2019), WNV (CDC, 2016), Potosi (Mitchell et al., 1998)
<i>Aedes (Ochlerotatus) trivittatus</i> (Coquillett 1902)	CUU	Ortega-Morales et al. 2020	EEEV (Armstrong et al. 2010), LACV (Wilkerson et al., 2015), TVTV (Foster y Walker, 2019), WNV (CDC, 2016)
<i>Aedes (Aedimorphus) vexans</i> (Meigen, 1830)	CUU	Ortega-Morales et al. 2019, Ortega-Morales et al. 2020	Banna (Liu et al., 2010), Chaoyang (Xia et al., 2018), EEEV (Armstrong y Andreadis, 2010), Potosi (Mitchell et al. 1998), TAHV, TVTV, WEEV, WNV (CDC, 2016; Duguma et al., 2020; Wilkerson et al., 2015)
<i>Anopheles (Anopheles) franciscanus</i> (McCracken, 1904)	CUU	Ortega-Morales et al. 2020, Vargas et al. 1956	WNV (CDC, 2016)
<i>Anopheles (Anopheles) punctipennis</i> (Say 1823)	CUU	Heinemann et al. 1977, Ibáñez et al. 1994, Ortega-Morales et al. 2020	<i>Plasmodium</i> spp. (Foster y Walker, 2019), WNV (CDC, 2016)
<i>Anopheles (Anopheles) pseudopunctipennis</i> (Theobald 1901)	CUU	Heinemann et al. 1977, Ibáñez et al. 1994, Ortega-Morales et al. 2020	<i>Plasmodium</i> spp. (Horsfall, 1955), WNV (Medina et al., 2008), VEEV (Sudia et al., 1975)
<i>Culex (Culex) coronator</i> (Dyar and Knab, 1906)	CUU	Heinemann et al. 1977, Ibáñez et al. 1994, Ortega-Morales et al. 2019b, Ortega-Morales et al. 2020	WNV (CDC, 2016), ZIKV (Elizondo-Quiroga et al., 2018)



<i>Culex (Melanoconion) erraticus</i> (Dyar and Knab, 1906)	CUU	Heinemann et al. 1977, Ibáñez et al. 1994, Ortega-Morales et al. 2019b, Ortega-Morales et al. 2020	WNV (CDC, 2016), VEEV (Chamberlain et al., 1969), ZIKV (Correa-Morales et al., 2019)
<i>Culex (Culex) erythrothorax</i> (Dyar 1907)	CUU	Ortega-Morales et al. 2020	WNV (CDC, 2016)
<i>Culex (Culex) quinquefasciatus</i> (Say, 1823)	CUU	Heinemann et al. 1977, Ibáñez et al. 1994, Ortega-Morales et al. 2019b, Ortega-Morales et al. 2020	WEEV, SLEV, WNV(CDC, 2016), ZIKV (Dávalos-Becerril et al., 2019)
<i>Culex (Culex) restuans</i> (Theobald, 1901)	CUU	Heinemann et al. 1977, Ibáñez et al. 1994, Ortega-Morales et al. 2019b, Ortega-Morales et al. 2020	SLEV, WNV (CDC, 2016)
<i>Culex (Culex) stigmatosoma</i> (Dyar, 1907)	CUU	Ibáñez et al. 1994, Ortega-Morales et al. 2019b, Ortega-Morales et al. 2020	SLEV (Foster y Walker, 2019), WNV (CDC, 2016)
<i>Culex (Culex) tarsalis</i> (Coquillett, 1896)	CUU	Heinemann et al. 1977, Ibáñez et al. 1994, Ortega-Morales et al. 2019b, Ortega-Morales et al. 2020	SLEV, WEEV, WNV (CDC, 2016), ZIKV (Correa-Morales et al., 2019)
<i>Culex (Neoculex) territans</i> (Walker, 1856)	CUU	Ortega-Morales et al. 2020	WNV (CDC, 2016)
<i>Culex (Culex) thriambus</i> (Dyar, 1921)	CUU	Heinemann et al. 1977, Ibáñez et al. 1994, Ortega-Morales et al. 2020	WNV (CDC, 2016)



<i>Psorophora (Grabhamia) signipennis</i> (Coquillett, 1904)	CUU	Heinemann et al. 1977, Ibáñez et al. 1994, Ortega-Morales et al. 2020	WNV(CDC, 2016)
Abreviaciones arbovirus: CHIKV, chikungunya virus; CVV, Cache Valley virus; DENV, dengue virus; EEEV, Eastern equine encephalitis virus; HJV, Highland J virus; JCV, Jamestone Canyon virus; LACV, La Crosse virus; ORUV, Orungo virus; POTV, Potosi virus; RVFV, Rift Valley fever virus; SINV, Sindbis virus; SLEV, St. Louis encephalitis virus; TAHV, Tahyna virus; TENV, Tensaw virus; TVTV, Trivittatus virus; VEEV, Venezuelan equine encephalitis virus; WEEV, Western equine encephalitis virus; WNV, West Nile virus; YFV, yellow fever virus; ZIKV, zika virus.			

3.6 Técnicas para la identificación de mosquitos.

3.6.1 Descripción morfológica y taxonómica del mosquito.

Los mosquitos son insectos delgados de patas largas que se reconocen fácilmente por su larga probóscide y la presencia de escamas en la mayoría de las partes del cuerpo. Las larvas se distinguen de otros insectos acuáticos por la ausencia de patas, la presencia de una cabeza característica con cepillos bucales y antenas, un tórax bulboso que es más ancho que la cabeza y el abdomen, papilas anales posteriores y un par de aberturas respiratorias presentes en mosquitos de la subfamilia Anophelinae o por medio sifón alargado presente en especies de la subfamilia Culicinae, llevado cerca del extremo del abdomen (Reinert et al., 2004). El tiempo de vuelo y la actividad de alimentación suele ser bastante específico para la mayoría de las especies. Algunas especies están activas de noche (nocturnas) o crepusculares (crepusculares) mientras que otras están activas durante las horas del día (diurnas) (Harbach, 2007).

Para la identificación de mosquitos hembras en Norteamérica se utilizan generalmente dos guías de claves taxonómicas publicadas; las de Carpenter y La Casse, 1955; Darsie y Ward, 2007. El libro “Mosquitos de América del Norte, Norte de México” de Carpenter y La Casse (1955), contiene claves taxonómicas para la identificación de mosquitos adultos hembras, de los huevos y de los estadios inmaduros (larva y pupa). Además, incluye las generalidades de los mosquitos, técnicas y artefactos para colectas y los protocolos que siguieron para preparar a los especímenes para su estudio.

Por otro lado, el trabajo de Darsie y Ward, publicado originalmente en 1981, está compuesto por claves taxonómicas para la identificación de mosquitos hembras adultas y el cuarto estadio larvario de las diversas especies de mosquitos en Norteamérica; así como también, su distribución (Darsie y Ward, 2005). En 2005, se publicó una actualización para este compendio de claves, de Darsie y Ward con algunos cambios muy importantes. Por ejemplo, la incorporación de los cambios recientes en la nomenclatura, nuevas listas de especies y actualizaciones de las distribuciones geográficas de los mosquitos de Norteamérica (Kline, 2006).

En términos generales, el cuerpo del mosquito adulto está compuesto de tres segmentos importantes: la cabeza, el tórax y el abdomen (Figura 4). Cada una de estas regiones del cuerpo tiene características importantes que pueden usarse en la identificación taxonómica de las diversas especies de mosquitos. La estructura de la cabeza tiene forma ovoide y la mayoría de la cabeza está ocupada por un par de grandes ojos compuestos. La cabeza tiene cinco secciones importantes: dos antenas, dos palpos y la probóscide. Las antenas surgen entre los ojos y están compuestas por 13-14 flagelómeros con espirales de setas en la base de cada segmento flagelar. El palpo maxilar consta de cinco palpómeros. En la base anteroventral de la cabeza, la trompa se extiende hacia adelante.

Se utilizan al menos nueve caracteres de la cabeza en las claves para la identificación tales como: la forma de la probóscide; las escamas presentes en la probóscide; la longitud y escamas del palpo; las escamas en el pedicelo de las antenas; la longitud de antenas y flagelómero; el ancho de la frente; el espacio interocular y las escamas en el dorso de la cabeza.

El tórax es la región del cuerpo entre la cabeza y el abdomen. Esta estructura se divide en tres segmentos: protórax, mesotórax y metatórax. El tórax tiene dos estructuras muy importantes que son las alas y las patas. Cada segmento del cuerpo lleva un par de patas. Las alas se encuentran en el mesotórax, el cual tiene un par de halterios nudosos que ayudan a mantener el equilibrio durante el vuelo. Los músculos de vuelo asociados con las alas funcionales se encuentran en el mesotórax, lo que contribuye a su gran tamaño. Los otros dos son de tamaño reducido. La esclerita más grande del cuerpo del mosquito es el *scutum* (“escudo” en latín) y su forma es más bien esferoide. En el *scutum*, se encuentran las setas y escamas con variación de color.

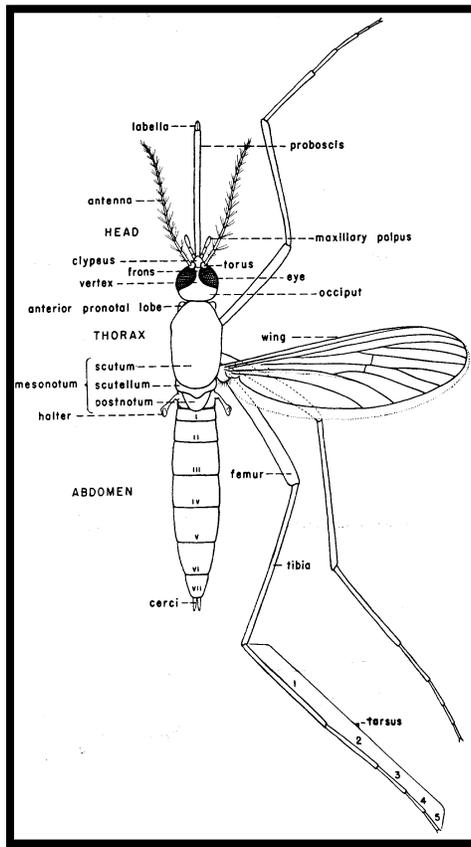


Figura 5. Diagrama de mosquito adulto hembra. Tomado de "Mosquitoes of North America" (Carpenter y La Casse, 1955).

El tórax es la región más grande del cuerpo del mosquito y, por lo tanto, a veces tiene características muy específicas para observar, para así, llevar a cabo una mejor identificación. Estas características son demasiado detalladas para ser descritas por el momento. El resto del tórax también presenta escamas y setas con variación de color. Los dos apéndices del tórax son las alas y patas funcionales. Las alas están unidas al mesotórax y están compuestas por una red de engrosamientos longitudinales llamados venas. Entre las venas se encuentran membranas estiradas translúcidas, conocidas como células. También se pueden ver setas (solo género *Culiseta*) y escamas con variación de color en las alas.

Las escamas pueden ser amplias y numerosas, de forma triangular, o estrechas y filiformes. Cada segmento torácico lleva un par de patas, compuesto de cinco partes cada una. Estos son la coxa, el trocánter, el fémur, la tibia y el tarso. El tarso está compuesto además por cinco tarsómeros. En el quinto se encuentra una garra o un diente. Las características clave en las patas son ciertos patrones de las escamas. La parte superior de la pata puede estar moteada y también se pueden encontrar anillos apicales/basales. El abdomen adulto del mosquito se compone de diez segmentos, tres de los cuales son de tamaño corto.

Los diez segmentos están compuestos por dos escleritos conectados por una membrana elástica que permite la expansión del tejido durante la alimentación de sangre y mientras la hembra es grávida. Los primeros siete segmentos (I-VII) tienen una estructura similar, pero los últimos tres segmentos (VIII-X) están acortados y modificados, especializados para reproducción y excreción. El abdomen también puede usarse para la identificación, ya que puede encontrar setas y escamas, aunque algunos géneros tampoco se presentan. La variación de color también puede ser observada.

3.6.2 El uso del DNA Barcode para la identificación molecular de especies.

El código de barras de ADN (DNA barcode) es una herramienta para la identificación rápida de especies basada en secuencias de ADN. Consisten en secuencias cortas de ADN estandarizadas de aproximadamente 400 a 800 pb. El objetivo de esta herramienta es el de utilizar la información de una o varias regiones genéticas para identificar todas las especies de los diversos organismos vivos, de manera rápida y rentable, los datos se pueden estandarizar y comparar fácilmente entre taxones (Kress y Erickson, 2012).

El gen de la citocromo c oxidasa subunidad I (COI) parece poseer un mayor rango de señal filogenética que cualquier otro gen mitocondrial y su evolución es lo suficientemente rápida como para permitir la discriminación no solo de especies estrechamente aliadas, sino también de grupos filogeográficos dentro de una sola especie. Existen desventajas al utilizar esta técnica, por ejemplo, el gen COI se hereda por vía materna y sus patrones de diversidad y evolución pueden verse fuertemente influenciados por microorganismos heredados, como *Wolbachia* (Xiao et al., 2010). Sin embargo, el gen COI tiene ventajas importantes debido a que es un gen bastante conservado entre especies, pero al mismo tiempo posee una variabilidad que ayuda a la identificación de la diversidad filogenética, por lo que es considerado por investigadores como una potencial herramienta taxonómica (Folmer et al., 1994; Hebert et al., 2003).

El gen COI, ha sido de utilidad en la caracterización de la diversidad de especies de artrópodos vectores. En 2018, se realizó la identificación de especies de simúlidos (moscas negras) presentes en varias regiones al este de España, debido a que estos artrópodos tienen un impacto negativo en la salud pública y animal a causa de el hábito hematófago de las hembras (Ruiz-Arrondo et al., 2018). Posteriormente, en 2019, se identificó por primera vez a la especie *Aedes japonicus* en ese mismo país (Eritja et al., 2019). El uso de esta herramienta molecular, favorece en proporcionar información correcta sobre la distribución, la biología y el comportamiento de las especies, de modo que las medidas de control puedan implementarse de manera apropiada (Ruiz-Arrondo et al., 2018).

Por otro lado, las especies crípticas, que son dos o más especies distintas que están clasificadas erróneamente bajo una sola especie, han desafiado la investigación taxonómica durante siglos. Para ello se han implementado las técnicas moleculares como los códigos de barras de ADN, para realizar su identificación. Sin embargo, las técnicas moleculares no son 100% exactas para la delimitación de especies, se deben combinar con otros tipos de datos para complementar la identificación de manera adecuada (Bickford et al., 2007; Xiao et al., 2010).

Existe una plataforma bioinformática integrada que es facilitada por el BOLD: The Barcode of Life Data System (<http://www.barcodinglife.org>). Dicha plataforma registra desde la recolección de muestras hasta la elaboración de las bibliotecas de códigos de barras y que es estrictamente validada. Básicamente funciona como un depósito de registros de muestras y secuencias de los diversos estudios de los códigos de barra, posteriormente se emplea para el análisis de datos de dichos códigos (Ratnasingham & Hebert, 2007).

3.7 Patógenos de interés médico y veterinario asociados a ETV.

El término “arbovirus” se refiere a “virus transmitidos por artrópodos, que como lo indica dicho término, se refiere a la transmisión biológica de un virus por artrópodos con hábitos hematófagos, denominados vectores; incluidos mosquitos, garrapatas y especies de moscas, en los cuáles se pueden multiplicar. Éstos virus se transmiten a hospederos susceptibles en dónde pueden completar su ciclo de vida y ser nuevamente propagados a otros vectores y/o hospederos, para así, repetir el ciclo (Gubler, 2002; Weaver y Barrett, 2004; Weaver y Reisen, 2010).

Se han documentado 134 arbovirus que causan enfermedades en seres humanos, del registro de 534 disponible en el Catálogo Internacional de Arbovirus (Karabatsos, 1985). La clasificación de los arbovirus es compleja, debido a que son muy diversos taxonomicamente, se dividen en 8 familias virales y 14 géneros distintos. Los arbovirus de importancia en salud pública pertenecen a tres familias distintas: *Flaviviridae*, *Togaviridae* y *Bunyaviridae* (Duane J Gubler, 2002). Las infecciones por arbovirus generalmente son zoonóticas, esto quiere decir, que dependen de las especies animales, más que de los humanos, para mantenerse en la naturaleza (Karabatsos, 1985). Algunos arbovirus pueden infectar de manera accidental al ser humano, pero normalmente resulta en un estancamiento, debido a que el hombre no contribuye en el ciclo transmisión al no desarrollar una viremia (en la mayoría de los casos) y así poder infectar a otros artrópodos que se alimenten de él (Gubler, 2002; Weaver y Reisen, 2010).



Existen factores que son esenciales para el establecimiento y mantenimiento del ciclo de transmisión de un arbovirus, son tres importantes factores que componen el ciclo: el arbovirus, el artrópodo y el vertebrado (hospedero “definitivo”). Estos tres componentes conforman una relación compleja y diversa, el arbovirus debe cumplir los requisitos para mantenerse en ambos hospederos y posteriormente ser transmitido (Beerntsen et al., 2000; Pfeffer y Dobler, 2010; Weaver y Reisen, 2010).

Los arbovirus transmitidos por mosquitos son de los más importantes en la actualidad, esto es debido a la reemergencia y distribución de estos patógenos en zonas no endémicas. Dentro de los principales arbovirus transmitidos por mosquitos tenemos a el DENV, ZIKV, CHIKV y el VON (Cigarroa-Toledo et al., 2016; Garza-Hernandez et al., 2018; Tolle, 2009). La gravedad de las infecciones por arbovirus pueden variar dependiendo de algunos factores, sobre todo el estado inmunológico del paciente, estas infecciones pueden ser desde asintomáticas hasta enfermedades fatales fulminantes. La clínica generalmente se clasifica como una enfermedad febril sistémica, fiebre hemorrágica o enfermedad neurológica invasiva (Gubler y Vasilakis, 2016).

En cuanto a parasitosis, la filariasis linfática (LF) es una enfermedad transmitida por mosquitos de los géneros *Aedes* spp., *Anopheles* spp., pero principalmente por especies de *Culex* spp., se distribuye en países tropicales y subtropicales. La infección es ocasionada por gusanos filariales, que invaden los ganglios linfáticos de los humanos iniciando cambios patológicos que conducen a manifestaciones posteriores de la enfermedad filarial. Las especies de nematodos que causan esta enfermedad incluyen principalmente a *Wuchereria bancrofti*, en menor medida *Brugia malayi*, *B. timori* y *Loa loa* en muy pequeña medida. Entre las enfermedades tropicales debilitantes transmitidas por vectores, la filariasis linfática se encuentra al lado de la malaria (Shenoy, 2008).

Todas las enfermedades antes mencionadas, se distribuyen de manera similar alrededor del mundo, sobre todo en países en vías de desarrollo, que abarcan desde Asia, África y Sudamérica, principalmente. Estos sitios poseen características medioambientales favorables para el desarrollo y distribución de los mosquitos vectores, tales como climas tropicales y subtropicales, temperaturas de 24 – 28°C, lluvias moderadas, atravesando también, por el cambio climático. Los factores sociodemográficos son cruciales en el incremento del riesgo de sufrir una enfermedad transmitida por vector (Gould et al., 2017; Vannavong et al., 2017).

3.7.1 El Virus del Oeste del Nilo (VON) y su evolución en México.

3.7.1.1 Generalidades del VON

El virus del Oeste del Nilo (VON) es un virus ARN positivo que pertenece a la familia *Flaviviridae* del género *Flavivirus*. Se relaciona taxonómicamente con el complejo antigénico del virus de la encefalitis japonesa (VEJ) que incluye a los virus de la encefalitis de San Luis (ESL), el virus de la encefalitis del Valle de Murray, entre otros. Es neuropatógeno en aves, equinos y humanos (Téllez et al., 2006).

El VON es transmitido por la picadura de un mosquito, comunmente especies de mosquitos del género *Culex sp.*, como *Cx. pipiens*, *C. quinquefasciatus*, *C. restuans*, entre otras (Anderson et al., 1999; T G Andreadis et al., 1994; W. K. Reisen et al., 2005), pero se ha demostrado que otras especies de mosquitos, como *Aedes* y *Anopheles*, pueden transmitirlo. Actualmente se ha encontrado el virus en 56 especies de mosquitos en los EUA (CDC, 2016). La infección de los vectores ocurre al alimentarse de sangre procedente de un hospedero infectado, ya sean aves, equinos, otros mamíferos o del hombre. Las garrapatas, tanto duras como blandas podrían ser vectores del VON, o al menos, un reservorio; se ha documentado que en las especies de garrapatas *Ixodes ricinus* y *Ornithodoros moubata*, la infección por el VON sí ocurre, sin embargo, solamente en *Ornithodoros moubata*, el virus se mantuvo durante 132 días, aunque su papel en la transmisión es aún incierto (Lawrie et al., 2004).



La transmisión se produce durante la picadura, pero su efectividad es variable dependiendo del mosquito vector y la zona de alimentación. Se ha encontrado evidencia de que el virus puede transmitirse directamente de persona a persona, la posible transmisión es de la madre al hijo a través de la leche materna (CDC, 2003). No se han documentado casos de transmisión directa de aves a los seres humanos.

En humanos, la enfermedad por el VON se presenta con fiebre, malestar general, anorexia, náusea, vómito, cefalea, mialgia, erupción cutánea y linfadenopatía. La principal manifestación clínica descrita para esta enfermedad es la encefalitis y la parálisis flácida. En edades avanzadas, el riesgo de presentar el cuadro clínico neurológico es mayor, así como también, la muerte del individuo. (Jeha et al., 2003; Sejvar et al., 2003)

El primoaislamiento de este virus ocurrió en 1937 de una mujer que presentaba un cuadro febril, este hecho aconteció en el distrito de West Nile en Uganda, en África, de ahí su particular nombre (Smithburn et al., 1940). Después de eso, se obtuvieron muestras de humanos, aves y mosquitos provenientes de otras regiones de África, Europa y Asia (Hayes, 1989; Hubálek y Halouzka, 1999).

La primera epidemia registrada de VON fue en Israel, ocurrió en 1951, en una comunidad de agricultores, donde se reportaron 123 casos en niños y adultos, presentando un cuadro clínico con los principales síntomas: fiebre, dolor de cabeza, mialgias, anorexia, dolor abdominal, exantemas y vómitos (Bernkopf et al., 1953; Marberg et al., 1956). Las epidemias más recientes han ocurrido en Argelia (1994), Rumania (1996-1997), Checoslovaquia (1997), República Democrática del Congo (1998), Rusia (1999), Israel y Francia (2000) y EEUU (1999-2002) (Sejvar, 2003).

3.7.1.2 Estructura y linaje del VON.

La estructura del virus es básicamente una partícula esférica de aproximadamente 50 nm de diámetro, el centro es un icosaedro compuesto de múltiples copias de proteína de la cápside, de 12 kDa mide de 30 a 35 nm de diámetro y encierra el genoma de ARN (sentido positivo) de aproximadamente 12,000 nucleótidos (Petersen & Roehrig, 2001).

La envoltura viral está constituida por dos glucoproteínas: la E y la M (membrana). La glucoproteína E es la proteína estructural de mayor importancia, debido a sus características particulares, hablando en términos estructurales e inmunológicos. Posee actividad hemaglutinante, interviene en la unión con la célula hospedera al encargarse del reconocimiento de receptores celulares y realiza la fusión de la membrana celular; además, induce la respuesta inmunológica mediada por células B y T, al promover la producción de anticuerpos neutralizantes. Debido a esto último, es posible la identificación serológica del virus. (Smithburn et al., 1940; Téllez et al., 2006).

Posteriormente, cuando el virus logra ingresar a la célula hospedadora, el ARN viral comienza la fase de traducción de su material genómico que funciona como una molécula de ARN mensajero. Inmediatamente, a través de varios procesos enzimáticos (degradación proteolítica), se producen un total de 10 proteínas virales maduras: 3 corresponden a componentes estructurales y 7 a componentes no-estructurales que intervienen en la replicación viral (Deubel et al., 2001).

El VON posee una diversidad genética y geográfica, por esta razón, se han propuesto de cuatro a cinco linajes genéticos del VON basados en análisis filogenéticos de aislamientos publicados en bases de datos (Bakonyi et al., 2005; Berthet et al., 1997; Bondre et al., 2007; Jia et al., 1999; Lanciotti et al., 2002; May et al., 2011; Scherret et al., 2001). Sus genomas difieren entre sí en más de un 20-25% y se correlacionan bien con el punto geográfico de aislamiento (Chancey et al., 2015).

Los virus del linaje I pueden infectar a humanos, mamíferos y a aves, se ha aislado en África, India, Europa, Asia y Norte América (Bakonyi et al., 2005; Bondre et al., 2007; Botha et al., 2008; May et al., 2011; Vázquez et al., 2010). Los virus del linaje II se mantienen hasta ahora en África de manera enzoótica. (McLean et al., 2002; Petersen y Roehrig, 2001) (Figura 5).

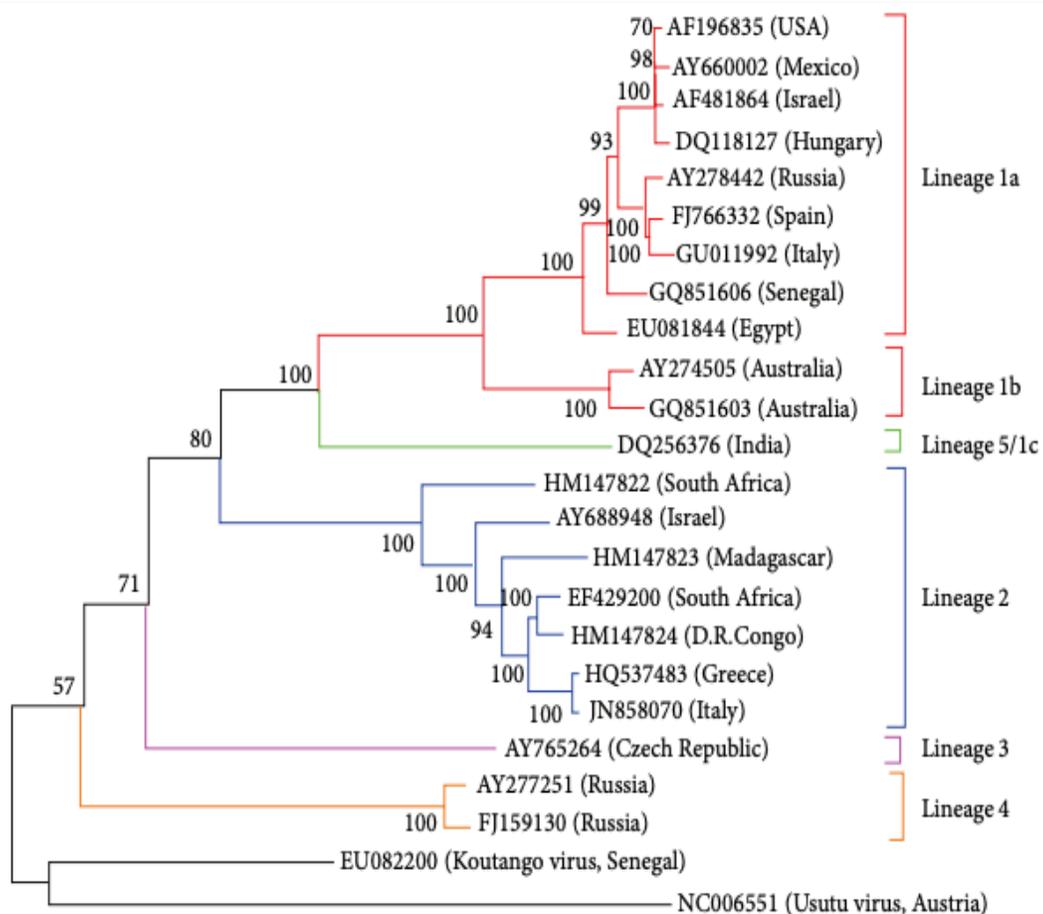


Figura 6. Árbol filogenético basado en las secuencias de nucleótidos completas de cepas seleccionadas del VON. El árbol filogenético de máxima verosimilitud se basa en secuencias genómicas completas y el intercambio de vecinos más cercano como método de búsqueda heurística. El árbol se construyó utilizando MEGA 6 con 1000 réplicas de bootstrap. El árbol fue enraizado usando al Virus Koutango y Usutu. Tomado de: *The Global Ecology and Epidemiology of West Nile Virus* (Chancey et al., 2015).

3.7.1.3 Importancia del VON en Mexico y EUA.

En los EUA, del año 1999 a 2016, se ha detectado al VON en 56 especies de mosquitos (CDC, 2016), siendo considerados los más importantes los mosquitos pertenecientes al complejo *Cx. pipiens*, principalmente porque son una especie común en áreas urbanas y porque cuando hay una mayor abundancia de estos vectores, pueden ocurrir brotes de la enfermedad (Keyghobadi et al., 2003).

El mosquito *Cx. quinquefasciatus* en estudios de laboratorio ha demostrado ser un vector eficiente en la transmisión del VON (Goddard et al., 2002; Turell et al., 2005). Se detectó en 2004, al VON en pools de mosquitos de esta especie en diversas localidades al sur de California, como en Arizona y en el estado de Baja California, México (Reisen et al., 2004).

El primer caso registrado en México de VON en humanos, ocurrió en el año 2002, fue un individuo que enfermó en EUA, procedente de Coahuila. Las evidencias de la actividad del VON en México han sido documentadas para Nuevo León, Chihuahua, Coahuila, Tamaulipas y Yucatán. Durante los años 2002 a 2003, se reportó la presencia de anticuerpos y se logró aislar el VON de caballos y aves (Beasley et al., 2004; Blitvich et al., 2003; Deardorff et al., 2006; Estrada-Franco et al., 2003; Loroño-Pino et al., 2003)

En el 2004 hubo un caso en Sonora y se detectaron con anticuerpos 188 aves y 793 caballos, mientras que en el 2005 no se reportó ningún caso en humanos y solo se detectaron anticuerpos en 90 aves y 814 caballos. Para el año 2006 se detectó un caso en humano en Oaxaca y la presencia de anticuerpos en 117 aves y 553 caballos.

A partir de el año 2007 a la fecha, no hay reportes de la presencia del virus en México. Una de las razones probables es el poco o nulo monitoreo y vigilancia en animales (aves y caballos, principalmente), pero sobre todo de las especies de mosquitos vectores.

4. JUSTIFICACIÓN

Los mosquitos son los principales vectores de patógenos causantes de enfermedades infecciosas a nivel mundial, por lo cual representan un importante problema de salud pública. Los cementerios son áreas críticas para el desarrollo de mosquitos, en consecuencia, para la distribución de patógenos. La ciudad de Chihuahua cuenta con aproximadamente 11 cementerios, localizados a las afueras de la ciudad y también cerca de centros urbanos importantes; de modo que, es indispensable la identificación de la biodiversidad de especies de mosquitos vectores; así como también, conocer su distribución en estos sitios, para así poder plantear medidas adecuadas para el control y prevención de las enfermedades transmitidas por mosquitos en la entidad. A la fecha, son pocos o nulos los estudios que se han realizado en este ámbito.

El VON es un arbovirus transmitido por la picadura de mosquitos, por lo regular, del género *Culex*. Ocasiona infección en aves, equinos y humanos (hospedero accidental). Es un virus perteneciente a la familia Flaviviridae, género *Flavivirus* y posee un genoma de ARN positivo. Debido a la dispersión del virus en EUA en el año 1999, autoridades de salud mexicanas iniciaron actividades de vigilancia epidemiológica en el año 2000, específicamente para la identificación del VON en el país. Posteriormente, la introducción del virus en México ocurrió en el año 2003. A partir de ese punto, los estudios para el aislamiento e identificación de las cepas presentes en México se hizo evidente. Es probable que las cepas que se encuentran actualmente circulando en México estén en un proceso de adaptación y evolución, con respecto al ecosistema y posteriormente desarrollen la capacidad de provocar grandes brotes en el país. Es necesario identificar las diferentes cepas o variantes del virus que se encuentran disponibles en bases de datos, para plantear las rutas de propagación y origen de las secuencias.

En lo que concierne al estado de Chihuahua, el estudio realizado por Mann en 2013, determinó que existe una circulación dinámica actualmente en curso del VON entre EUA y México. Se aislaron 2 secuencias genómicas de el VON, provenientes de pools de mosquitos *Culex quinquefasciatus*. Es importante destacar que es el único arbovirus aislado de Chihuahua que su secuencia genómica se encuentra en la base de datos de GenBank.

Aunado a lo anterior, es de suma importancia conocer la diversidad de cepas del VON presentes en México, así como también, en la frontera de Chihuahua-EUA, con base a un análisis filogenético, para así determinar la divergencia de las cepas aisladas a través de los años.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general.

Generar un registro de mosquitos asociados a cementerios de la ciudad de Chihuahua.

5.2 Objetivos específicos.

- Identificar la biodiversidad de mosquitos presentes en cementerios de la ciudad de Chihuahua.
- Realizar un análisis filogenético de las secuencias del gen NS5 del VON disponibles para México.
- Establecer la divergencia entre las cepas del VON aisladas en Chihuahua-EUA con respecto a las demás disponibles en México, con base a la variación de nucleótidos en las secuencias.

6. HIPÓTESIS

La identificación morfológica y molecular de las diversas especies de mosquito que se encuentren presentes en cementerios de la ciudad de Chihuahua, permitirá conocer la culicofauna asociada a ETV, principalmente arbovirosis, en estas zonas de la entidad. Los aislados del VON originarios de Chihuahua están bien representados formando grupo con otros aislados en Norteamérica.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 Área de estudio.

Durante el periodo abril – diciembre de 2019 se realizaron cuatro colectas en cementerios de la ciudad de Chihuahua, Chihuahua, México; los sitios de muestreos fueron los siguientes: el Panteón Municipal I localizado en las coordenadas “28.613643, -106.050691”, el Panteón Municipal II “28.611437, -106.052212”, el Panteón Municipal de Dolores “28.615537, -106.053875” y por último el Panteón San José “28.689654, -106.112687”, durante la temporada de lluvia en la entidad, abarcando el periodo Agosto – Octubre de 2019. Los criaderos artificiales dentro de estos establecimientos son un factor importante en el desarrollo y distribución de enfermedades transmitidas por mosquitos (Vezzani, 2007). En el mapa de la ciudad se pueden observar los sitios dónde se llevaron a cabo las colectas. Al sur de la ciudad, tres de los puntos se encuentran en el mismo sector, mientras que el otro se ubica al norte de la ciudad (Figura 7).

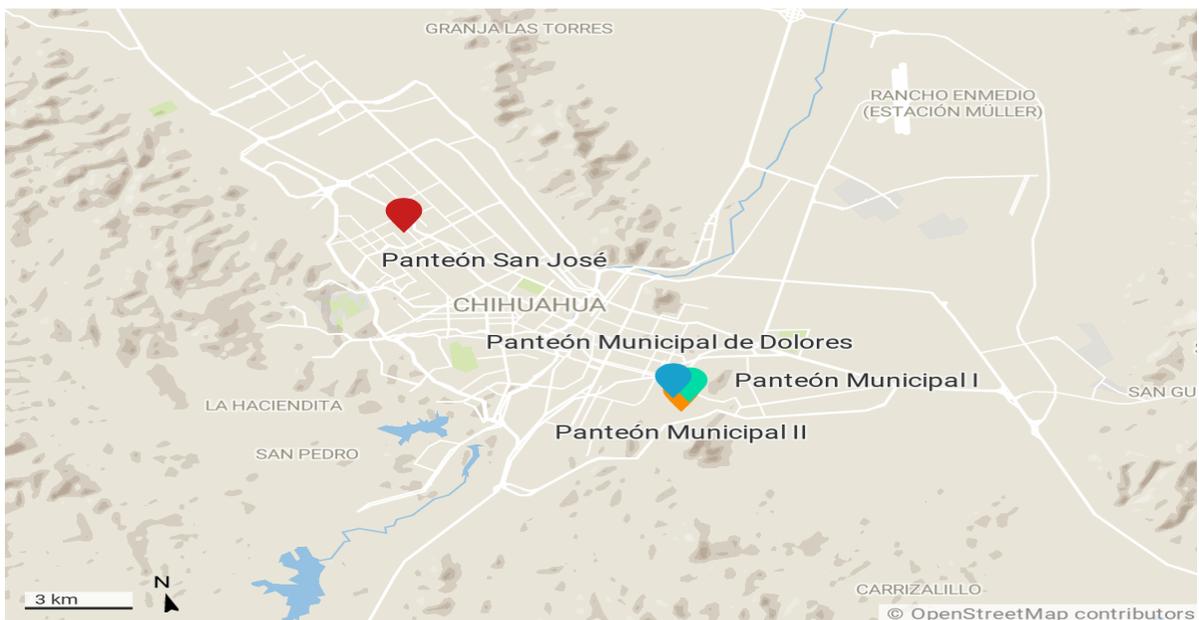


Figura 7. Mapa de panteones muestreados en la ciudad de Chihuahua. Se muestran los puntos de muestreo: panteón Jardines de San José marcado con el indicador de color rojo; panteones municipales I, II y de Dolores, marcados con los indicadores de color verde, amarillo y azul respectivamente. Creado con Datawrapper.



7.2 Colecta de etapas inmaduras de mosquitos.

Dentro de los sitios de muestreo, se buscaron potenciales criaderos antropogénicos de mosquitos (Figura 8). Al identificarlos, se llevó a cabo la colecta de especímenes mediante la técnica de pipeteo manual, utilizando una pipeta de transferencia transparente de 5 ml, una charola blanca de 4" (BYP, México) y bolsas estériles transparentes de 250 ml (Whirl-Pak®, USA). A cada sitio se le asignó un ID dependiendo del orden y la fecha de colecta; colocando el número del primer sitio, el día, mes y año de la colecta (Ejemplo.- 0102AG19).

La primera colecta se realizó en el Panteón Municipal I el día 02 de agosto de 2019 a las 12:00 h. Se tomaron muestras en 3 sitios distintos donde se observaron recipientes que contenían agua estancada y presencia de larvas de mosquitos, generalmente se observaron adultos cerca de dichos recipiente.

La segunda colecta se llevó a cabo en el Panteón municipal II el día el día 14 de agosto de 2019 a las 11:00 h. Se tomaron muestras en 3 sitios diferentes, las larvas fueron tomadas de recipientes que contenían agua estancada, donde se observó la presencia de adultos cerca de dichos recipientes. En el último sitio se tomó de una pila con agua estancada donde claramente se podía observar la presencia de adultos ahogados y larvas respirando casi en la superficie del agua.

La tercera colecta se realizó en el Panteón Municipal de Dolores el día 09 de septiembre de 2019 a las 10:30 h, aproximadamente. Se tomaron muestras en 6 sitios diferentes en donde se logró observar la presencia de potenciales criaderos de mosquitos. Algunos adultos fueron colectados durante el muestreo, mientras se posaban para alimentarse se capturaron con un tubo de polipropileno de 50 mL (Corning®, Estados Unidos) que contenía un par de gotas de etanol al 80%.

La cuarta y última colecta en la ciudad se llevó a cabo en el Panteón Jardines de San José ubicado al norte de la ciudad de Chihuahua el día 09 octubre de 2019 a las 15:00 h aproximadamente. Se tomaron muestras en 4 sitios diferentes en donde se logró observar la la presencia de potenciales criaderos de mosquitos (recipientes con agua).



Figura 8. Sitios de muestreo en panteones de la ciudad de Chihuahua. **Panteón municipal I.** Panel A. Vista general del PM1. Panel B. Florero metálico colocado a un lado de la lápida. Panel C. Florero de cerámica. Panel D. Florero largo de piedra colocado a los pies de la lápida. **Panteón municipal II.** Panel E. Vista general del PM2. Panel F. Florero de cerámica colocado a un lado de la lápida. Panel G. Pila de agua estancada. Panel H. Florero de cerámica colocado a un lado de la lápida. **Panteón municipal de Dolores.** Panel I. Vista general del PMD. Panel J. Florero de cristal colocado a un lado de la lápida. Panel K, L. Florero de cerámica colocado a un lado de la lápida. Panel M, N. Recipiente de plástico con agua colocado a un lado de la lápida. Panel Ñ. Recipiente metálico con agua colocado a un lado de la lápida. **Panteón Jardines de San José.** Panel O. Vista general del PJSJ. Panel P - R. Florero de cerámica colocado al nivel del pasto, a un lado de la lápida. Panel S. Valde utilizado para rellenar floreros y lavar lápidas.

7.3 Crianza de mosquitos en laboratorio.

Se realizó la crianza artificial en laboratorio de las larvas colectadas en campo, bajo condiciones controladas de temperatura, alimento y ciclo de luz. Se colocaron de manera individual en vasos de plástico Solo® de 9 oz. (Dart Container Corporation, USA) y en recipientes de plástico de 5 L para pooles de más de 100 larvas, agregando agua del sitio del muestreo y agua destilada en una relación 1:1 para las individuales y solamente agua destilada a los pooles.

Se alimentaron con comida para peces Super Flakes (Biomaa, México), se adicionó una hojuela a cada recipiente individual cada 2-3 días, para los recipientes de mayor volumen se adicionaba alrededor de 1 gramo. El ciclo luz-oscuridad se estableció en 16:8 h. La temperatura ambiente fue de los 27 +/- 1°C (Belkin et al., 1965; Kauffman et al., 2017). Las pupas que se observaron diariamente, se colocaron en un criador de mosquitos (mosquito breeder) fabricado con recipientes de plástico de 400 mL, unidos mediante pegamento UHU® (UHU GmbH & Co. KG, Alemania) y acoplados a una tapa de plástico con domo abierto, cubierta con gasa médica para impedir la salida de los adultos que fueran emergiendo (Figura 9).

Los criadores de mosquito se llenaron con 200 mL de agua destilada, y se cambió cada 48-72 h. Al emerger los adultos, se colectaron utilizando un aspirador manual fabricado con manguera industrial transparente 1/2" Surtek (Grupo Urrea, México), manguera para gas 3/8" Surtek (Grupo Urrea, México) cubierta de un extremo con gasa médica para evitar el paso del mosquito, manguera de látex para mechero 3/8" y una punta de micropipeta de 1 ml, por la cual se realiza el aspirado (Figura 10). Los mosquitos adultos se transfirieron a una cámara letal que consta de un tubo de ensayo de 30x200 mm, relleno de una capa de caucho en pequeños fragmentos, una capa de algodón y sobre esa capa una tira de papel filtro cortado a la medida del ancho del tubo. Por último, se adicionan de 2-3 gotas de cloroformo (Sigma Aldrich, USA) (Figura 11).

Después de llevar a cabo la eutanasia de los mosquitos, se colocaron en tubos eppendorf de 1.5 mL de manera individual y agrupados en pools de 20 dependiendo del sitio de muestreo. Por último se llevaron a criopreservación a -80°C .



Figura 9. Criador de mosquitos (*mosquito breeder*). Dispositivo fabricado para la crianza del último estadio larvario (pupa).

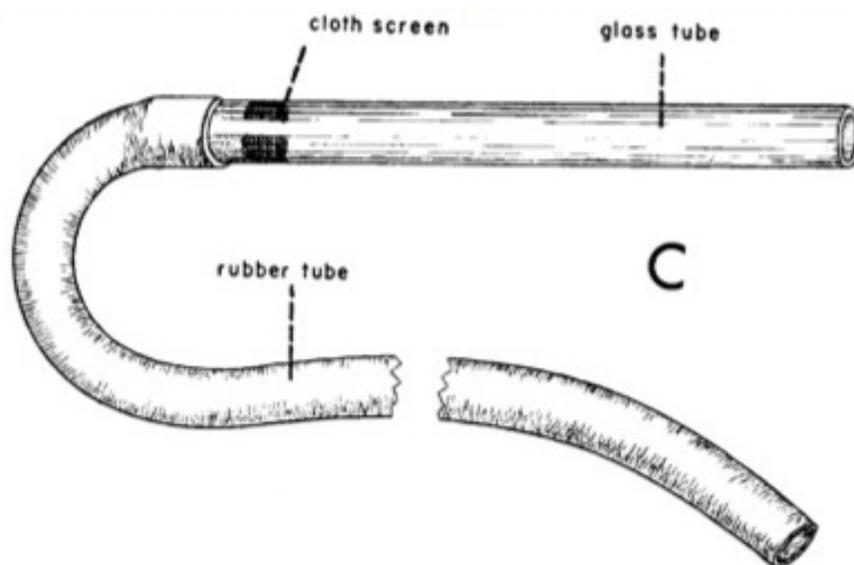


Figura 10. Aspirador manual de mosquitos. Tomado de "Mosquitoes of North America" (Carpenter & La Casse, 1955)



Figura 11. Cámara letal de cloroformo. Tomado de "Mosquitoes of North America" (Carpenter & La Casse, 1955)

7.4 Identificación morfológica de mosquitos.

Se prepararon 6 placas frías utilizando cajas Petri de vidrio junto con gel refrigerante y se llevaron a congelación a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Los mosquitos adultos provenientes de la crianza artificial, se colocaron en las placas frías, se separaron y clasificaron por género y sexo. Posteriormente, se realizó la identificación de especies mediante el uso de claves taxonómicas (Carpenter & La Casse, 1955; Darsie Jr., R. F. & Ward, 2005) bajo un microscopio estereoscópico de luz ZEISS Stemi 305 (ZEISS, Alemania) (Figura 12). Este trabajo de tesis se centró en la identificación de mosquitos adultos hembras y machos, por lo que las claves larvarias no fueron de interés. Las claves para los mosquitos adultos consistieron primero en una clave dicotómica para los géneros y luego, más específicamente, la especie.

Posteriormente los mosquitos se agruparon en pools (hasta máximo 20 mosquitos en cada pool) por especie, sexo y sitios de recolección, se colocaron en crioviales para su almacenamiento adecuado a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, para posteriores análisis moleculares. Por otro lado, se apartaron 40 especímenes, por especie y sitio de colecta para llevar a cabo la extracción de ADN y consecuentemente la generación de los códigos de barra de ADN de cada especie.

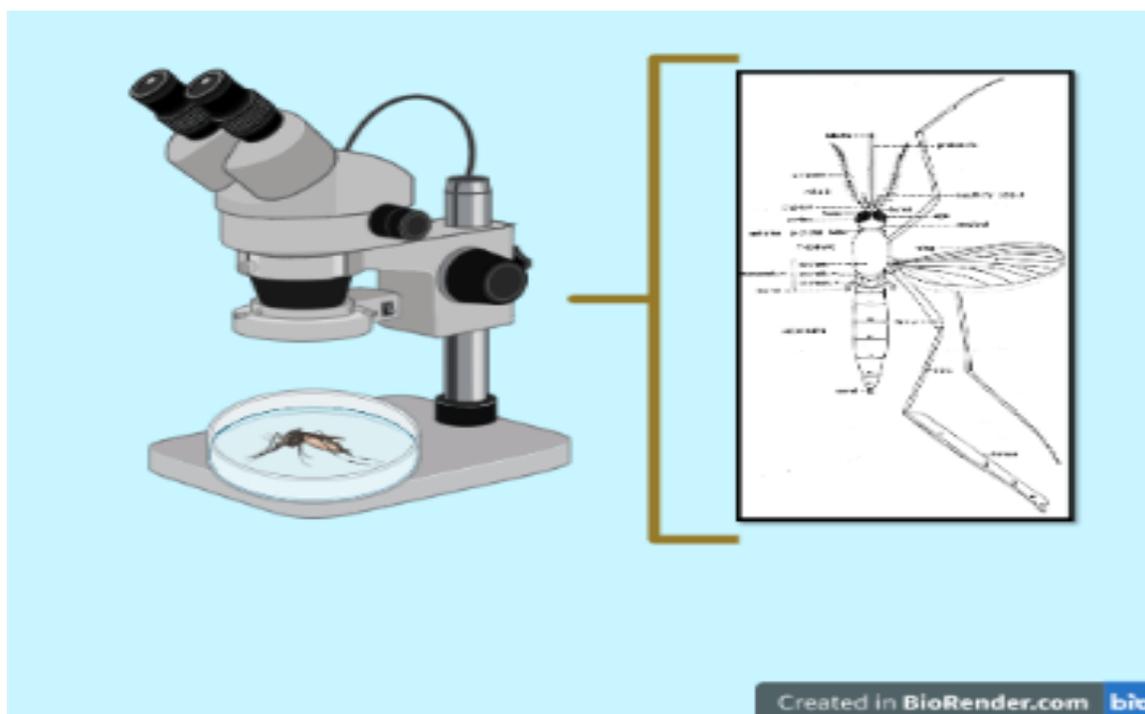


Figura 12. Identificación morfológica de los mosquitos. Creada en biorender.com

7.5 Análisis molecular y bioinformático

7.5.1 Extracción y cuantificación de ADN para PCR y secuenciación.

El ADN total se extrajo de 40 especímenes usando el kit comercial DNeasy blood and tissue (Qiagen®, USA), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se extrajo ADN de las dos patas frontales de cada mosquito. Se tomaron las patas con unas pinzas entomológicas limpias y estériles, y se homogeneizaron con un triturador de tejidos desechable (Biomasher II™, USA).



Se realizó la cuantificación del ADN total utilizando un espectrofotómetro Genova Nano (Jenway, Reino Unido) y se almacenó a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su posterior análisis. Se utilizó un par de primers [5 μM], sentido LCO1490 (5'-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3') y antisentido HCO2198 (5'-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA-3') para amplificar un fragmento de 658 pb del gen COI (Folmer et al., 1994). Cada reacción de PCR fue de 25 μL y se realizó con 12.5 μL de GoTaq® Green Master Mix Kit (Promega, Estados Unidos), 3 μL de ADN extraído, 3.5 μL de agua libre de nucleasas y además de 0.6 μM de cada primer.

Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un termociclador modelo c1000 (Bio-Rad, EUA), bajo las condiciones propuestas en el protocolo de Cywinska et al., 2006, que consiste en un ciclo de 1 min a $95\text{ }^{\circ}\text{C}$, 35 ciclos de 1 min a $94\text{ }^{\circ}\text{C}$, 1 min a $55\text{ }^{\circ}\text{C}$, 1,5 min a $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ y un ciclo final de 7 min a $72\text{ }^{\circ}\text{C}$. Los productos de PCR se visualizaron en geles de agarosa al 1,5% teñidos con bromuro de etidio (Sigma Aldrich, Estados Unidos).

Los productos de PCR y secuenciación serán evaluados en una etapa posterior del proyecto de investigación. Los resultados del proyecto se presentan hasta este punto como ajuste a los protocolos bajo las condiciones laborales pertinentes permitidas durante la contingencia sanitaria actual por COVID-19.

7.5.2 Análisis filogenético del Virus del Oeste del Nilo (VON) en México y la frontera Chihuahua – Estados Unidos.

El VON es el único arbovirus que ha sido aislado en Chihuahua y que se tiene registrado su genoma en la base de datos Genbank. La divergencia de las secuencias de las cepas aisladas en el estado de Chihuahua con respecto a las demás disponibles en bases de datos para México.

Se recolectaron secuencias de GenBank del gen ns5 del VON disponibles para México y de la frontera de Chihuahua y de Texas, EUA. (Mann et al., 2013). Las secuencias se editaron y alinearon utilizando el software MEGA X, aplicando el algoritmo de MUSCLE. Se construyeron árboles filogenéticos separados mediante diversos algoritmos, primeramente por máxima parsimonia (MP), luego mediante Neighbor Joining (NJ), ambos implementados en el software MEGA X (Kumar et al., 2018; Stecher et al., 2020). Los parámetros para la construcción filogenética incluyeron un modelo de sustitución de parámetros Kimura-2 y p-distance con tasas de distribución gamma utilizando el método de búsqueda heurística de intercambio de vecinos más cercano (Kimura, 1980; Saitou y Nei, 1987). La robustez de la agrupación se determinó mediante análisis bootstrap con 1000 repeticiones (Felsenstein, 1985). Se calcularon las distancias genéticas de las 26 diferentes cepas aisladas en México y y de Texas, EUA (Figura 13).

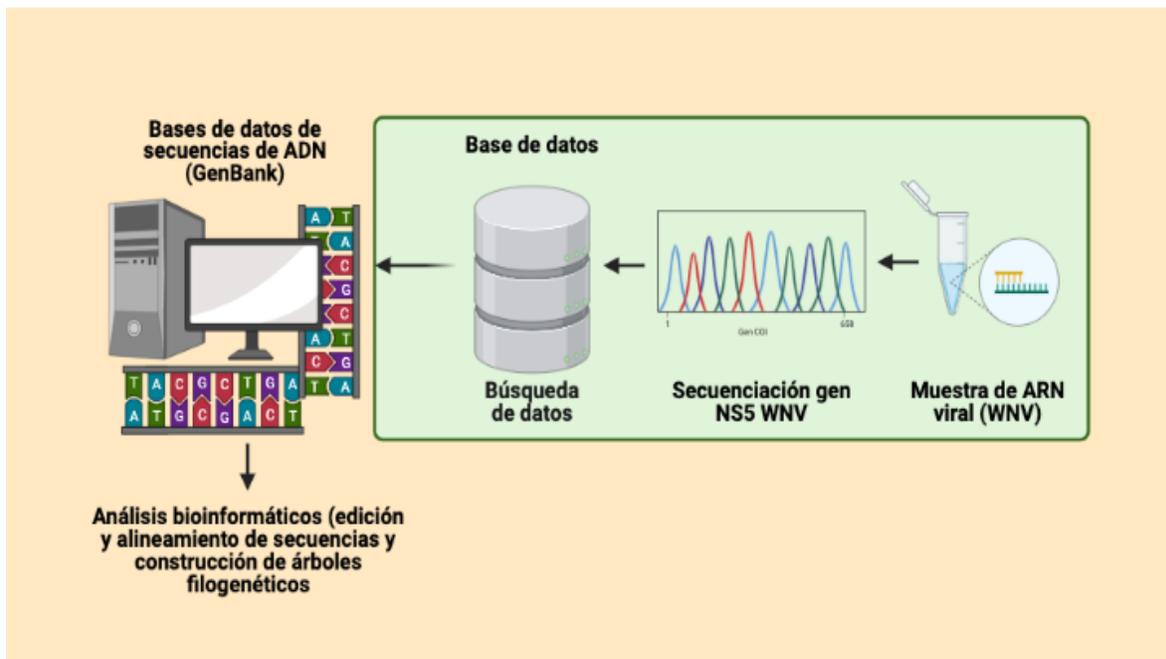


Figura 13. Proceso de los análisis bioinformáticos para el VON. Se obtienen las secuencias disponibles del VON de otros estudios, las cuales se encuentran en bases de datos. Posteriormente se lleva a cabo la edición y alineamientos correspondientes de las secuencias, con base en el gen de interés, en este caso el NS5 del VON. Por último, se elaboran los árboles filogenéticos para observar la divergencia entre las diferentes cepas aisladas y registradas en las bases de datos. Creado con Biorender.

8. RESULTADOS

8.1 Número de mosquitos colectados y criados en laboratorio.

En los muestreos realizados se colectaron 205 larvas de mosquito en el Panteón Municipal I, 1,300 en el Panteón Municipal II, 975 en el Panteón Municipal de Dolores y 770 en el Panteón Jardines de San José. Un total de 3,250 larvas fueron colectadas, de las cuales emergieron 741 adultos de la crianza, mientras que 16 adultos adicionales fueron colectados en campo (Tabla 3).

Tabla 3. Mosquitos colectados y criados en cementerios de la ciudad de Chihuahua.

Sitios de colecta en Chihuahua	Larvas colectadas	Adultos criados
Panteón Municipal I	205	61
Panteón Municipal II	1300	27
Panteón Municipal de Dolores	975	191
Panteón San José	770	462
Cantidad Total	3250	741

Se muestra la cantidad total de estadios inmaduros colectados por sitio de colecta, así como también, la cantidad de adultos emergidos de la crianza artificial.

8.2 Identificación morfológica de mosquitos.

De los mosquitos provientes de la crianza, se identificaron dos géneros importantes, *Aedes* y *Culex*; dentro de éstos géneros se lograron identificar 6 especies diferentes: *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus 1762), *Culex (Culex) quinquefasciatus* (Say, 1823), *Culex (Culex) restuans* (Theobald, 1901), *Culex (Culex) stigmatosoma* (Dyar, 1907), *Culex (Culex) tarsalis* (Coquillett, 1896), and *Culex (Neoculex) territans* (Walker, 1856). La especie más predominante en estos sitios es *Culex quinquefasciatus*. Otras especies como *Culex tarsalis* y *Aedes aegypti* se encuentran presentes en un menor porcentaje. *Culex restuans*, *Culex stigmatosoma* y *Culex territans*, no fueron tan comunes. Sin embargo, son importantes ya que también pueden ser vectores potenciales. La identificación de algunos ejemplares no se logró realizar debido al desgaste físico (especímenes incompletos y/o dañados). Por cada sitio de muestreo se clasificaron por especie y sexo (Tabla 4).

Tabla 4. Identificación y distribución de especies de mosquitos.

Especies de mosquito por sitio de colecta	Panteón Municipal de Dolores	Panteón Municipal I	Panteón Municipal II	Panteón San Jose	Cantidad Total
<i>A. aegypti</i> ♀	29	1	1	30	61
<i>A. aegypti</i> ♂	2	24	10	20	56
<i>Cx. quinquefasciatus</i> ♀	99	6	6	124	235
<i>Cx. quinquefasciatus</i> ♂	49	8	9	130	196
<i>Cx. tarsalis</i> ♀	1	--	--	60	61
<i>Cx. tarsalis</i> ♂	--	5	1	85	91
<i>Cx. territans</i> ♀	--	7	--	--	7
<i>Cx. territans</i> ♂	--	5	--	--	5
<i>Cx. restuans</i> ♀	2	--	--	--	2
<i>Cx. stigmatosoma</i> ♀	--	--	--	1	1
NO ID	25	5	--	12	42
Cantidad Total	207	61	27	462	757

Cantidad de especímenes identificados y clasificados por especie, sexo y sitio de colecta. ♀ = Mosquito hembra. ♂ = Mosquito macho.

8.3 Análisis molecular: extracción, cuantificación.

Se obtuvo el ADN total extraído de dos patas frontales de cada uno de los mosquitos dispuestos para la realización de los códigos de barras de la vida, para cada una de las especies identificadas mediante taxonomía. A continuación, se muestra la concentración obtenida de cada espécimen (Tabla 5).

Tabla 5. Cuantificación del ADN total.

Sitio de colecta	Especie de mosquito	Concentración de ADN ($\mu\text{g/ml}$)	ID extracción
Panteón Municipal I	<i>A. aegypti</i>	10.2	1
	<i>A. aegypti</i>	11.1	2
	<i>A. aegypti</i>	6.8	3
	<i>Cx. tarsalis</i>	9.0	4
	<i>Cx. tarsalis</i>	29.8	5
	<i>Cx. tarsalis</i>	12.2	6
	<i>Cx. territans</i>	6.4	7
	<i>Cx. territans</i>	2.7	8
	<i>Cx. territans</i>	27.2	9
	<i>Cx. territans</i>	4.7	10
	<i>Cx. quinquefasciatus</i>	3.7	11
	<i>Cx. quinquefasciatus</i>	17.9	12
	<i>Cx. quinquefasciatus</i>	28.1	13
Panteón Municipal de Dolores	<i>A. aegypti</i>	23.6	14
	<i>A. aegypti</i>	6.7	15
	<i>A. aegypti</i>	5.5	16
	<i>Cx. quinquefasciatus</i>	2.2	17
	<i>Cx. quinquefasciatus</i>	14.3	18
	<i>Cx. quinquefasciatus</i>	7.8	19
	<i>Cx. tarsalis</i>	22.2	20
	<i>Cx. tarsalis</i>	18.9	21
Panteón Municipal II	<i>A. aegypti</i>	2.9	23
	<i>A. aegypti</i>	24.9	24
	<i>A. aegypti</i>	7.3	25

	<i>Cx. quinquefasciatus</i>	3.4	26
	<i>Cx. quinquefasciatus</i>	4.7	27
	<i>Cx. quinquefasciatus</i>	14.2	28
	<i>Cx. tarsalis</i>	1.9	29
Panteón San José	<i>A. aegypti</i>	17.5	30
	<i>A. aegypti</i>	15.4	31
	<i>A. aegypti</i>	18.9	32
	<i>Cx. tarsalis</i>	12.5	33
	<i>Cx. tarsalis</i>	8.4	34
	<i>Cx. tarsalis</i>	19.7	35
	<i>Cx. quinquefasciatus</i>	23.0	36
	<i>Cx. quinquefasciatus</i>	19.2	37
	<i>Cx. quinquefasciatus</i>	14.8	38
	<i>Cx. restuans</i>	20.4	39
<i>Cx. stigmatosoma</i>	15.1	40	

Cantidad de ADN extraído de cada uno de los especímenes identificados por sitio de muestreo.

8.4 Análisis filogenético del Virus del Oeste del Nilo (VON) en México.

Se recopilaron secuencias completas y parciales del genoma del VON, utilizando la base de datos de GenBank, y tomando como referencia para el estudio las secuencias disponibles para México del gen ns5 del VON. Así mismo, se tomaron 9 secuencias depositadas en GenBank de nueve aislamientos de VON en mosquitos, recolectados en El Paso, Texas, EUA y Ciudad Juárez, Chihuahua, México. Se alinearon y limpiaron un total 26 secuencias, los números de acceso y su descripción se muestran más adelante (Tabla 6). El análisis filogenético de las secuencias con números de acceso JX015515 – JX015523 pertenecientes a El Paso y Cd. Juárez, se han descrito anteriormente (Mann et al., 2013).

Una región de 537 pb (178 aminoácidos) del gen NS5, que comprende desde 9,858 a 10395 pb del genoma del VON y 3077 a 3254 aminoácidos de la proteína ns5, fue alineada para cada una de las secuencias; la numeración es basada en la secuencia aislada del gen NS5 del VON con número de acceso de GenBank: EU919683, el cual presenta una única sustitución silenciosa de nucleótidos en comparación con la cepa NY99 del VON (Ulloa et al., 2009). Se encontró que la secuencia de estudio DQ080071, se agrupó junto con la secuencia prototipo (Figura 14, 15, 16) en el análisis filogenético mediante los métodos de máxima parsimonia y neighbor joining. De las 26 secuencias se obtuvo la distancia total de sustitución de nucleótidos de hasta 0.005479 entre sí, con un error estándar (SE) de 0.001705 (Tabla 7 y 8).

8.4.1 Análisis de máxima parsimonia de taxones.

La historia evolutiva se infirió utilizando el método de máxima parsimonia (Figura 14). El árbol de consenso de arranque inferido de 1,000 réplicas se toma para representar la historia evolutiva de los taxones analizados (Felsenstein, 1985). Las ramas correspondientes a las particiones reproducidas en menos del 50% de réplicas de bootstrap están colapsadas. El porcentaje de réplicas de árboles en los que los taxones asociados se agruparon en la prueba de arranque (1000 réplicas) se muestra junto a las ramas (Felsenstein, 1985).

El árbol MP se obtuvo mediante el algoritmo Subtree-Pruning-Regrafting (SPR) (Nei y Kumar, 2000) con nivel de búsqueda 1 en el que los árboles iniciales se obtuvieron mediante la adición aleatoria de secuencias (10 repeticiones). Este análisis involucró 26 secuencias de nucleótidos. Hubo un total de 537 posiciones en el conjunto de datos final. Los análisis evolutivos se realizaron en MEGA X (Kumar et al., 2018; Stecher et al., 2020).



8.4.2 Relaciones evolutivas de taxones – NJ/K2P.

La historia evolutiva se infirió utilizando el método de NJ o unión de vecinos (Figura 15) (Saitou y Nei, 1987). El árbol de consenso bootstrap inferido a partir de 1,000 réplicas se toma para representar la historia evolutiva de los taxones analizados (Felsenstein, 1985). Las ramas correspondientes a las particiones reproducidas en menos del 50% de réplicas de bootstrap están colapsadas. El porcentaje de réplicas de árboles en los que los taxones asociados se agruparon en la prueba de arranque (1,000 réplicas) se muestra junto a las ramas (Felsenstein, 1985). Las distancias evolutivas se calcularon utilizando el método de 2 parámetros de Kimura (Kimura, 1980) y están en unidades del número de sustituciones de bases por sitio. Este análisis involucró 26 secuencias de nucleótidos. Todas las posiciones ambiguas se eliminaron para cada par de secuencias (opción de eliminación por pares). Hubo un total de 537 posiciones en el conjunto de datos final. Los análisis evolutivos se realizaron en MEGA X (Kumar et al., 2018; Stecher et al., 2020).

8.4.3 Relaciones evolutivas de taxones – NJ/p – distance.

La historia evolutiva se infirió utilizando el método de NJ (Saitou & Nei, 1987). El árbol de consenso bootstrap inferido a partir de 1000 réplicas (Felsenstein, 1985) se tomó para representar la historia evolutiva de los taxones analizados (Felsenstein, 1985). Las ramas correspondientes a las particiones reproducidas en menos del 50% de réplicas de bootstrap están colapsadas. El porcentaje de réplicas de árboles en los que los taxones asociados se agruparon en la prueba de arranque (1000 réplicas) se muestra junto a las ramas (Felsenstein, 1985). Las distancias evolutivas se calcularon utilizando el método de la P-distancia (Nei & Kumar, 2000) que estiman las unidades (nucleotidos) diferentes por sitio. Este análisis involucró 26 secuencias de nucleótidos. Todas las posiciones ambiguas se eliminaron para cada par de secuencias (opción de eliminación por pares). Hubo un total de 537 posiciones en el conjunto de datos final. Los análisis evolutivos se realizaron en MEGA X (Kumar et al., 2018; Stecher et al., 2020).

Tabla 6. Secuencias completas y parciales del VON disponibles en GenBank para México.

Accesión	Tamaño de la secuencia	Región del genoma	Hospedero	Región	Año de colecta	Descripción
AY660002	11029	UTR5->NS5	N/A	México	2003	West Nile virus isolate Mex03 from Mexico, complete genome
DQ080060	10972	UTR5->UTR3	<i>Corvus</i>	México		West Nile virus isolate WNVCC polyprotein precursor, gene, complete cds
DQ080063	10975	UTR5->UTR3	<i>Columbidae</i>	México		West Nile virus isolate TVP9223 polyprotein precursor, gene, complete cds
DQ080064	11001	UTR5->NS5	<i>Fulica</i>	México		West Nile virus isolate TVP9222 polyprotein precursor, gene, complete cds
DQ080065	10995	UTR5->NS5	<i>Quiscalus</i>	México		West Nile virus isolate TVP9221 polyprotein precursor, gene, complete cds
DQ080066	11001	UTR5->NS5	<i>Phalacrocoracidae</i>	México		West Nile virus isolate TVP9220 polyprotein precursor, gene, complete cds
DQ080067	11001	UTR5->NS5	<i>Butorides virescens</i>	México		West Nile virus isolate TVP9219 polyprotein precursor, gene, complete cds
DQ080068	11001	UTR5->NS5	<i>Ardeidae</i>	México		West Nile virus isolate TVP9218 polyprotein precursor, gene, complete cds



Continuación.

<u>DQ080069</u>	10975	UTR5->UTR3	<i>Equus caballus</i>	México		West Nile virus isolate TVP9117 polyprotein precursor, gene, complete cds
<u>DQ080070</u>	11001	UTR5->NS5	<i>Quiscalus</i>	México		West Nile virus isolate TVP9115 polyprotein precursor, gene, complete cds
<u>DQ080071</u>	11000	UTR5->NS5	<i>Equus caballus</i>	México		West Nile virus isolate FL234 polyprotein precursor, gene, complete cds
<u>EU919683</u>	537	Flavi_NS5	<i>Culex interrogator</i>	México	2006	West Nile virus from Mexico polyprotein gene, partial cds
<u>JN051152</u>	10998	UTR5->UTR3	<i>Corvus</i>	México	2003	West Nile virus strain TM171-03 subclone pp1 polyprotein precursor, gene, complete cds
<u>JN051153</u>	10998	UTR5->UTR3	<i>Corvus</i>	México	2003	West Nile virus strain TM171-03 subclone pp5 polyprotein precursor, gene, complete cds
<u>JX015515</u>	10954	UTR5->UTR3	<i>Culex tarsalis</i>	EUA (El Paso, Texas)	2005	West Nile virus isolate TX_AR5-2686 polyprotein gene, complete cds
<u>JX015516</u>	11002	UTR5->UTR3	<i>Culex tarsalis</i>	EUA (El Paso, Texas)	2007	West Nile virus isolate TX_AR7-6745 polyprotein gene, complete cds
<u>JX015517</u>	10994	UTR5->UTR3	<i>Culex tarsalis</i>	EUA (El Paso, Texas)	2008	West Nile virus isolate TX_AR8-5947 polyprotein gene, complete cds



Continuación.

<u>JX015518</u>	11001	UTR5- >NS5	<i>Culex quinquefasciatus</i>	México	2008	West Nile virus isolate TX_AR8-6866 polyprotein gene, complete cds
<u>JX015519</u>	11018	UTR5- >NS5	<i>Culex quinquefasciatus</i>	EUA (El Paso, Texas)	2009	West Nile virus isolate TX_AR9-5282 polyprotein gene, complete cds
<u>JX015520</u>	10949	UTR5- >UTR3	<i>Culex quinquefasciatus</i>	México	2009	West Nile virus isolate TX_AR9-6115 polyprotein gene, complete cds
<u>JX015521</u>	10999	UTR5- >NS5	<i>Culex tarsalis</i>	EUA (El Paso, Texas)	2009	West Nile virus isolate TX_AR9-7465 polyprotein gene, complete cds
<u>JX015522</u>	10976	UTR5- >UTR3	<i>Culex tarsalis</i>	EUA (El Paso, Texas)	2010	West Nile virus isolate TX_AR10-5718 polyprotein gene, complete cds
<u>JX015523</u>	10997	UTR5- >NS5	<i>Culex tarsalis</i>	EUA (El Paso, Texas)	2010	West Nile virus isolate TX_AR10-6572 polyprotein gene, complete cds
<u>KU978769</u>	11040	UTR5- >NS5	<i>Corvus</i>	México	2003	West Nile virus isolate TM 171-03 polyprotein (AUF34_00001) gene, complete cds

Las secuencias completas y parciales del gen NS5 del VON para México, están disponibles en GenBank por el National Center for Biotechnology Information (NCBI) <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/VirusVariation/Database/nph-select.cgi?taxid=11082>.

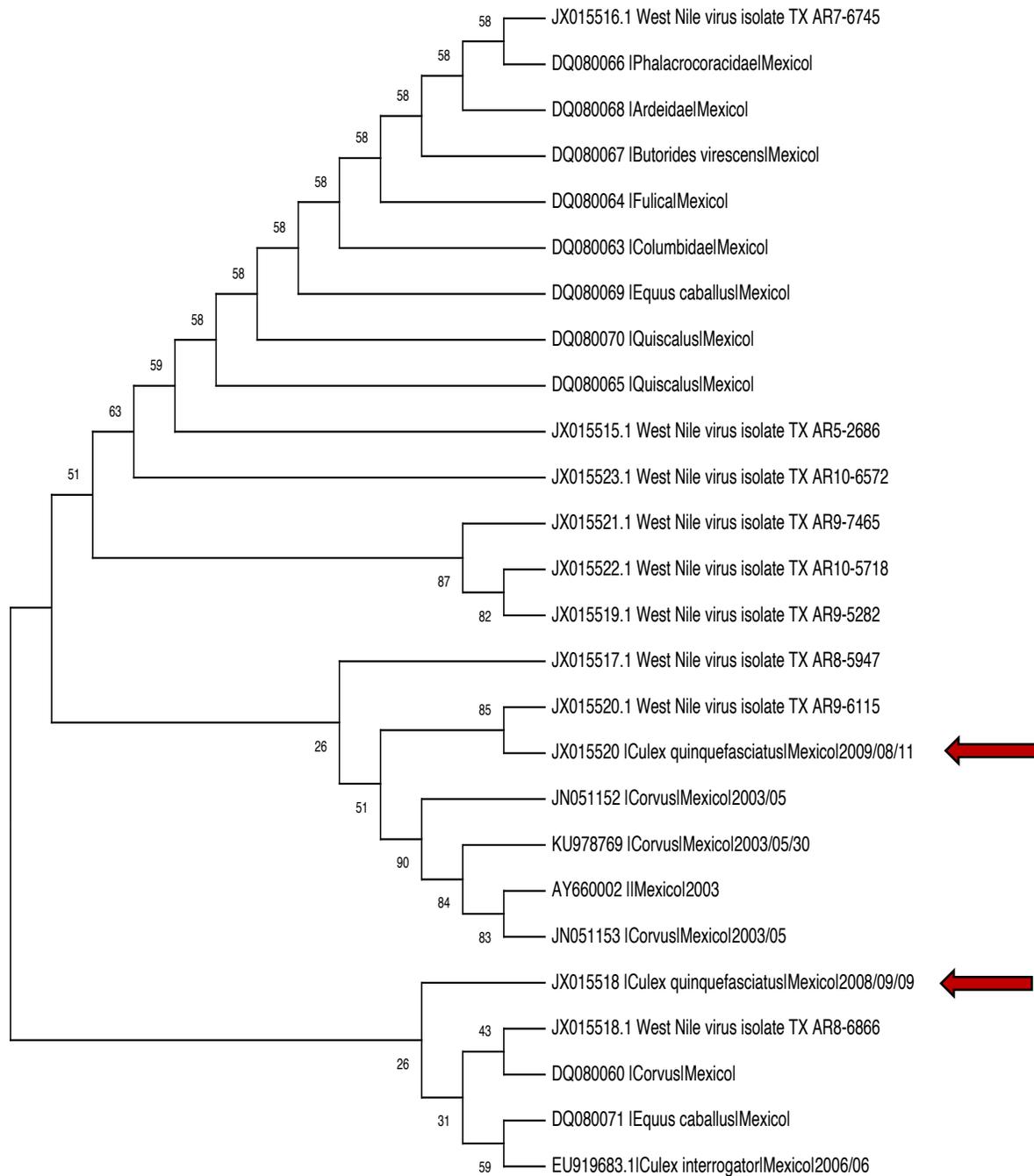


Figura 14. Árbol filogenético de máxima parsimonia (MP) de cepas del WNV disponibles en México y la frontera Chihuahua - EUA. Indicado con flechas rojas, se encuentran las secuencias aisladas en Chihuahua.

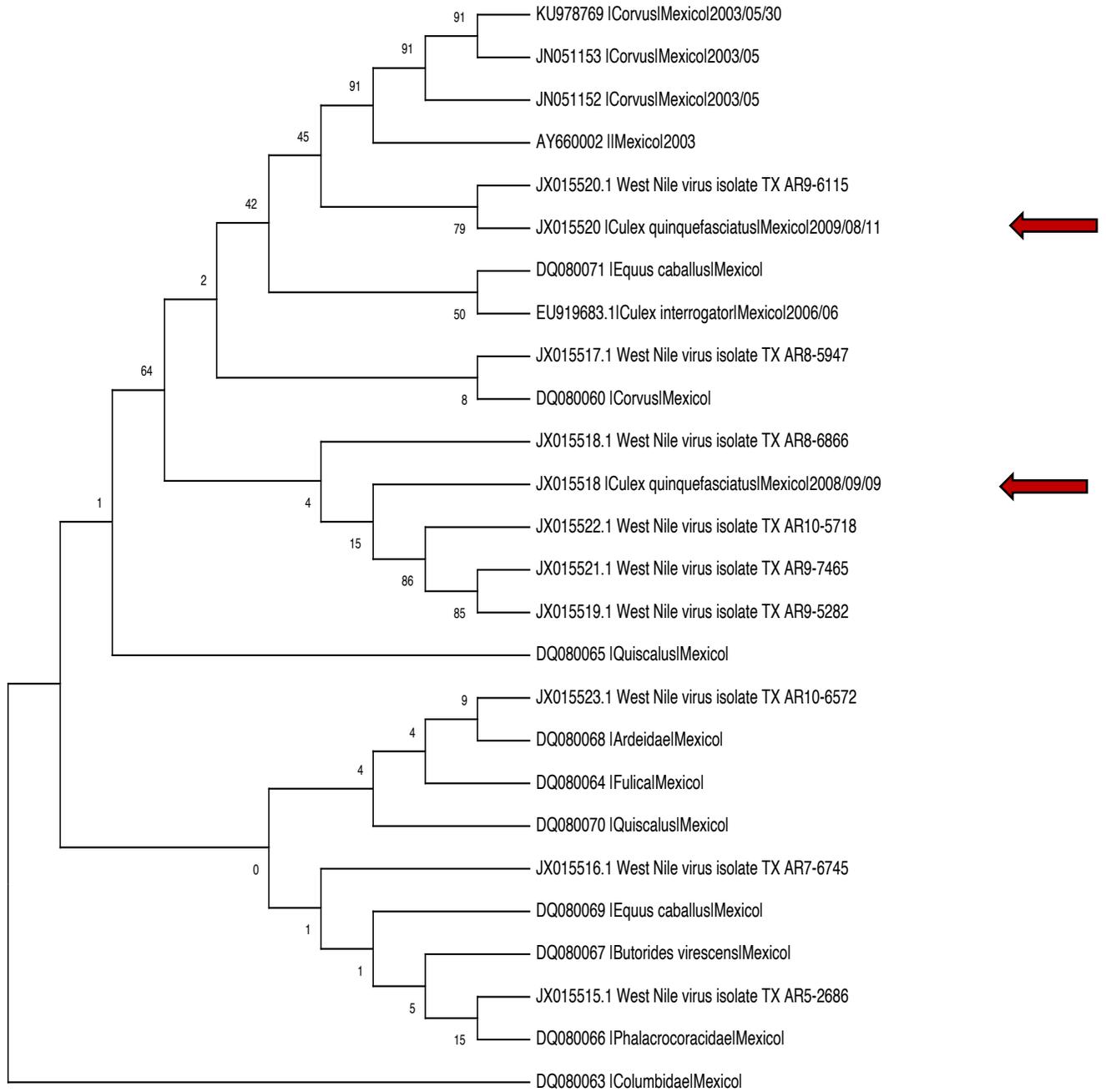


Figura 15. Árbol filogenético de Neighbor Joining (NJ) y Kimura 2 parameters (K2P) de cepas del WNV disponibles en México y la frontera Chihuahua - EUA. Indicado con flechas rojas, se encuentran las secuencias aisladas en Chihuahua.

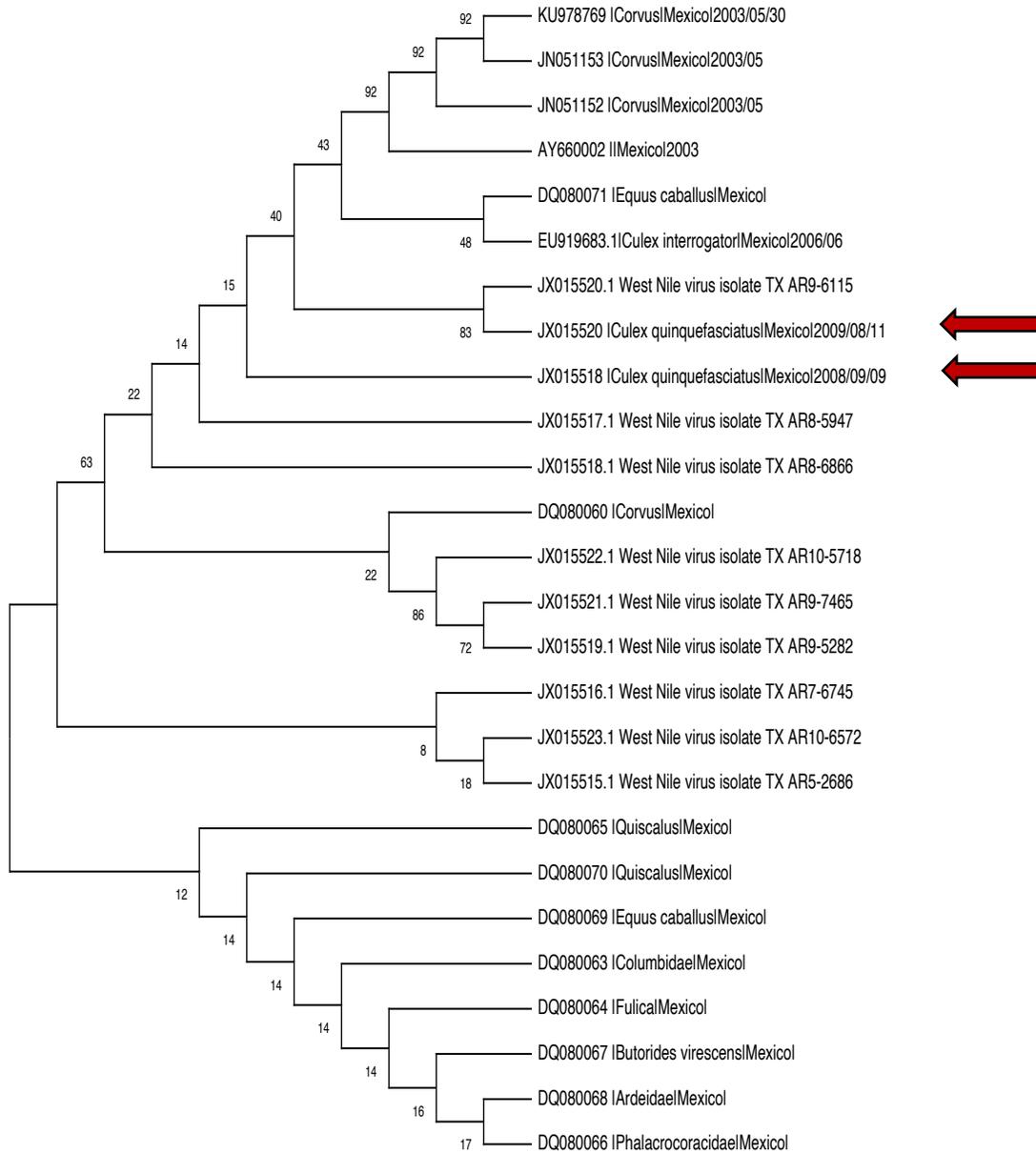


Figura 16. Árbol filogenético de Neighbor Joining (NJ) y p-distance de cepas del WNV disponibles en México y la frontera Chihuahua – EUA.



Tabla 7. Estimaciones de divergencia evolutiva entre las secuencias del VON.

Número de accesión	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	
JX015523.1		0.004	0.004	0.004	0.004	0.003	0.003	0.002	0.003	0.005	0.002	0.005	0.003	0.002	0.002	0.002	0.002	0.005	0.005	0.002	0.004	0.002	0.004	0.002	0.004	0.004	
JX015522.1	0.008		0.002	0.004	0.000	0.003	0.003	0.003	0.004	0.005	0.003	0.005	0.003	0.003	0.003	0.003	0.003	0.005	0.005	0.003	0.004	0.003	0.004	0.003	0.004	0.004	
JX015521.1	0.009	0.002		0.004	0.002	0.003	0.003	0.004	0.004	0.005	0.004	0.005	0.003	0.004	0.004	0.004	0.004	0.005	0.005	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	
JX015520.1	0.008	0.008	0.009		0.004	0.003	0.003	0.003	0.004	0.004	0.003	0.004	0.003	0.003	0.003	0.003	0.003	0.004	0.004	0.003	0.000	0.003	0.004	0.003	0.004	0.004	
JX015519.1	0.008	0.000	0.002	0.008		0.003	0.003	0.003	0.004	0.005	0.003	0.005	0.003	0.003	0.003	0.003	0.003	0.005	0.005	0.003	0.004	0.003	0.004	0.003	0.004	0.004	
JX015518.1	0.004	0.004	0.006	0.004	0.004		0.000	0.002	0.003	0.004	0.002	0.004	0.000	0.002	0.002	0.002	0.002	0.004	0.004	0.002	0.003	0.002	0.003	0.002	0.003	0.003	
JX015517.1	0.004	0.004	0.006	0.004	0.004	0.000		0.002	0.003	0.004	0.002	0.004	0.000	0.002	0.002	0.002	0.002	0.004	0.004	0.002	0.003	0.002	0.003	0.002	0.003	0.003	
JX015516.1	0.002	0.006	0.008	0.006	0.006	0.002	0.002		0.002	0.004	0.000	0.004	0.002	0.000	0.000	0.000	0.000	0.004	0.004	0.000	0.003	0.000	0.003	0.000	0.003	0.003	
JX015515.1	0.004	0.008	0.009	0.008	0.008	0.004	0.004	0.002		0.005	0.002	0.005	0.003	0.002	0.002	0.002	0.002	0.005	0.005	0.002	0.004	0.002	0.004	0.002	0.004	0.004	
AY660002	0.011	0.011	0.013	0.008	0.011	0.008	0.008	0.009	0.011		0.004	0.000	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.000	0.000	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.005	0.004
DQ080065	0.002	0.006	0.008	0.006	0.006	0.002	0.002	0.000	0.002	0.009		0.004	0.002	0.000	0.000	0.000	0.000	0.004	0.004	0.000	0.003	0.000	0.003	0.000	0.003	0.003	
JN051152	0.011	0.011	0.013	0.008	0.011	0.008	0.008	0.009	0.011	0.000	0.009		0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.000	0.000	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.005	0.004
JX015518	0.004	0.004	0.006	0.004	0.004	0.000	0.000	0.002	0.004	0.008	0.002	0.008		0.002	0.002	0.002	0.002	0.004	0.004	0.002	0.003	0.002	0.003	0.002	0.003	0.003	
DQ080070	0.002	0.006	0.008	0.006	0.006	0.002	0.002	0.000	0.002	0.009	0.000	0.009	0.002		0.000	0.000	0.000	0.004	0.004	0.000	0.003	0.000	0.003	0.000	0.003	0.003	
DQ080069	0.002	0.006	0.008	0.006	0.006	0.002	0.002	0.000	0.002	0.009	0.000	0.009	0.002	0.000		0.000	0.000	0.004	0.004	0.000	0.003	0.000	0.003	0.000	0.003	0.003	
DQ080063	0.002	0.006	0.008	0.006	0.006	0.002	0.002	0.000	0.002	0.009	0.000	0.009	0.002	0.000	0.000		0.000	0.004	0.004	0.000	0.003	0.000	0.003	0.000	0.003	0.003	
DQ080064	0.002	0.006	0.008	0.006	0.006	0.002	0.002	0.000	0.002	0.009	0.000	0.009	0.002	0.000	0.000	0.000		0.004	0.004	0.000	0.003	0.000	0.003	0.000	0.003	0.003	
KU978769	0.011	0.011	0.013	0.008	0.011	0.008	0.008	0.009	0.011	0.000	0.009	0.000	0.008	0.009	0.009	0.009	0.009		0.000	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.005	0.004
JN051153	0.011	0.011	0.013	0.008	0.011	0.008	0.008	0.009	0.011	0.000	0.009	0.000	0.008	0.009	0.009	0.009	0.009	0.000		0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.005	0.004
DQ080067	0.002	0.006	0.008	0.006	0.006	0.002	0.002	0.000	0.002	0.009	0.000	0.009	0.002	0.000	0.000	0.000	0.000	0.009	0.009		0.003	0.000	0.003	0.000	0.003	0.003	
JX015520	0.008	0.008	0.009	0.000	0.008	0.004	0.004	0.006	0.008	0.008	0.006	0.008	0.004	0.006	0.006	0.006	0.006	0.008	0.008	0.006		0.003	0.004	0.003	0.004	0.004	
DQ080068	0.002	0.006	0.008	0.006	0.006	0.002	0.002	0.000	0.002	0.009	0.000	0.009	0.002	0.000	0.000	0.000	0.000	0.009	0.009	0.000	0.006		0.003	0.000	0.003	0.003	
DQ080071	0.008	0.008	0.009	0.008	0.008	0.004	0.004	0.006	0.008	0.008	0.006	0.008	0.004	0.006	0.006	0.006	0.006	0.008	0.008	0.006	0.008	0.006		0.003	0.004	0.003	
DQ080066	0.002	0.006	0.008	0.006	0.006	0.002	0.002	0.000	0.002	0.009	0.000	0.009	0.002	0.000	0.000	0.000	0.000	0.009	0.009	0.000	0.006	0.000	0.006		0.003	0.003	
DQ080060	0.008	0.008	0.009	0.008	0.008	0.004	0.004	0.006	0.008	0.011	0.006	0.011	0.004	0.006	0.006	0.006	0.006	0.011	0.011	0.006	0.008	0.006	0.008	0.006		0.004	
EU919683.1	0.008	0.008	0.009	0.008	0.008	0.004	0.004	0.006	0.008	0.008	0.006	0.008	0.004	0.006	0.006	0.006	0.006	0.008	0.008	0.006	0.008	0.006	0.004	0.006	0.008		



Se muestra el número de sustituciones de bases por sitio entre secuencias. Las estimaciones de SE se muestran encima de la diagonal. Los análisis se realizaron utilizando el modelo de 2 parámetros de Kimura (Kimura, 1980). La variación de la tasa entre los sitios se modeló con una distribución gamma (parámetro de forma = 1). Este análisis involucró 26 secuencias de nucleótidos. Las posiciones de codón incluidas fueron 1^a + 2^a + 3^a + Sin codificación. Todas las posiciones ambiguas se eliminaron para cada par de secuencias (opción de eliminación por pares). Hubo un total de 537 posiciones en el conjunto de datos final. Los análisis evolutivos se realizaron en MEGA X (Kumar et al., 2018; Stecher et al., 2020).

Tabla 8. Estimaciones de divergencia evolutiva promedio en todos los pares de secuencias.

Distancia genética total	Desviación estándar
0.005479234	+/-0.001766291

Se muestra el número de sustituciones de bases por sitio a partir del promedio de todos los pares de secuencias. Las estimaciones de error estándar se muestran en la segunda columna y se obtuvieron mediante un procedimiento de arranque (1000 repeticiones). Los análisis se realizaron utilizando el modelo de 2 parámetros de Kimura (Kimura, 1980). La variación de la tasa entre los sitios se modeló con una distribución gamma (parámetro de forma = 1). Este análisis involucró 26 secuencias de nucleótidos. Las posiciones de codón incluidas fueron 1^a + 2^a + 3^a + Sin codificación. Todas las posiciones ambiguas se eliminaron para cada par de secuencias (opción de eliminación por pares). Hubo un total de 537 posiciones en el conjunto de datos final. Los análisis evolutivos se realizaron en MEGA X (Kumar et al., 2018; Stecher et al., 2020).

9. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

9.1 Discusión.

Para realizar la crianza artificial de mosquitos, existen varios factores importantes a considerar, Por ejemplo, las condiciones medioambientales óptimas que se establecen a nivel laboratorio/insectario (Belkin et al., 1965; Kauffman et al., 2017). Durante la crianza de las larvas colectadas en los Panteones Municipales I y II, se establecieron solamente la temperatura y el agua del sitio de muestreo como únicos factores determinantes. Sin embargo, una gran cantidad de larvas no sobrevivieron debido a la saturación de espacio en los recipientes (más de 20 larvas en un solo recipiente), lo que conlleva al estrés de las larvas y a la competencia por el alimento disponible, desencadenando en el poco o nulo desarrollo de las diferentes fases larvianas. También existen microorganismos entomopatógenos que pueden inhibir el desarrollo de las diferentes fases del ciclo de vida del mosquito, especialmente la larvaria; algunos de estos microorganismos han sido utilizados como biocontrol para la reducción de vectores, tales como: bacterias, protozoarios, nemátodos y entre los más importantes, se encuentran los hongos (Scholte et al., 2004). Las principales especies de hongos entomopatógenos utilizados como biocontrol de dípteros, son pertenecientes a los siguientes géneros: *Langenidium*, *Coelomomyces*, *Entomophthora*, *Culicinomyces*, *Beauveria* y *Metarhizium* (Pacheco Hernández et al., 2019).

Las condiciones de crianza implementadas con los especímenes colectados en el panteón de Dolores y en el panteón Jardines de San José, fueron más rigurosas, por ejemplo: el rango de temperatura se estableció entre 26 – 28°C; la fuente de agua constaba de agua del medio de colecta y agua destilada en relación 1:1; la fuente de alimento suministrada fue comida para peces en hojuelas; los recipientes fueron de mayor volumen (5 L) y se ajustó el ciclo de luz – oscuridad (16/8 horas); siguiendo estas consideraciones descritas, se logró aumentar el número de adultos obtenidos a través de la crianza.

En el estado de Chihuahua se han identificado alrededor de 25 especies de mosquitos, la mayoría de ellas están asociadas con patógenos transmisibles que pueden infectar a los vertebrados, incluidos los humanos (Heinemann et al., 1977; Martini, 1935; Ortega-Morales y Nava, 2020; Sudia et al., 1975; Vargas, 1941; Vargas y Martínez- Palacios, 1956; Vargas, 1956).

Se lograron identificar las siguientes especies de mosquitos en los cementerios de la ciudad de Chihuahua: *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus 1762), *Culex (Culex) quinquefasciatus* (Say, 1823), *Culex (Culex) restuans* (Theobald, 1901), *Culex (Culex) stigmatosoma* (Dyar, 1907), *Culex (Culex) tarsalis* (Coquillett, 1896) y *Culex (Neoculex) territans* (Walker, 1856).

Correspondiente al género *Aedes*, se cuenta con el registro de una de las especies más importantes relacionada con las enfermedades transmitidas por mosquitos, *A. aegypti*. Los arbovirus asociados a esta especie son numerosos y variados, dentro de los más representativos se encuentra el CHIKV, DENV, EEEV, RVFV, SLEV, VEEV, WEEV, WNV, YFV, ZIKV, entre otros (Andreadis et al., 2014; Armstrong y Andreadis, 2010; Carpenter y La Casse, 1955; Pitzer et al., 2009; Turell et al., 2005).

De la misma manera, hay registros de que las especies de mosquitos del género *Culex*, identificadas en estos sitios como: *Cx. quinquefasciatus*, *Cx. restuans*, *Cx. stigmatosoma*, *Cx. tarsalis* y *Cx. territans*; pueden transmitir diferentes arbovirus y parásitos. Arbovirus como el EEEV, SLEV, WEEV y VON, son algunos de los más representativos, así como también, parásitos como *Dirofilaria immitis*, han sido identificados en estas especies de mosquitos (Bingham et al., 2016; Ledesma & Harrington, 2011; Pitzer et al., 2009; Turell et al., 2005).



Estudios previos sobre el VON en México, han llegado a proponer diferentes formas y etapas en las que el virus se introdujo al país. Con base al análisis filogenético de secuencias obtenidas de aislamientos en el norte y sur de México, en 2003, se propuso que el VON ha ingresado al menos en dos ocasiones distintas. La primera proveniente de la frontera norte entre México y EUA, mientras que la segunda, procedente del sureste de EUA. Las secuencias aisladas en el norte de México del VON forman un grupo relacionado con cepas del oeste y sur de EUA, mientras la cepa aislada en el estado de Tabasco, forma otro grupo distinto, relacionandose con cepas del sureste de EUA (Blitvich et al., 2003; Deardorff et al., 2006; Estrada-Franco et al., 2003). La forma en que el VON pudo ingresar de EUA a México fue posiblemente a través de las aves migratorias que viajan de Norteamérica hacia el sur, entre las cuales están las rutas migratorias del Pacífico, Centro y Golfo, que pudieron haber introducido el VON circulante en el norte de México (Guerrero-Sánchez et al., 2011; Rappole et al., 2000; Ulloa et al., 2009)

Se tomaron secuencias de la región del gen ns5 del VON, del nucleótido 9,858 al 10395. Se seleccionaron secuencias disponibles en bases de datos (GenBank) disponibles para México y de EUA, particularmente procedentes de El Paso, Texas. Se hicieron árboles filogenéticos mediante los algoritmos de MP y NJ; para inferir la historia evolutiva de las diferentes secuencias analizadas.



9.2 Conclusiones.

La Identificación de la biodiversidad de especies de mosquitos en cementerios de la ciudad de Chihuahua es un elemento clave para la asistencia en la vigilancia de enfermedades emergentes y reemergentes a cargo de la secretaría de salud en la entidad. El conocimiento de las poblaciones de mosquitos en toda la ciudad sería bastante útil para que se aumenten las medidas preventivas. Sobre todo en el ámbito social, al fomentar la educación de la comunidad sobre la reducción de criaderos artificiales, especialmente, en sitios como cementerios.

La ciudad de Chihuahua se encuentra en el centro del estado, por lo que al ser una ciudad de paso hacia otros municipios, estados y los EUA, diversos factores pueden favorecer la distribución de vectores y la introducción de nuevas especies a la región, incluidos patógenos no endémicos.

Es necesario comprender la relación entre la biodiversidad, distribución y ecología de los mosquitos, con respecto a la posible presencia de patógenos transmitidos por ellos, particularmente en cementerios de la ciudad, para así mejorar la vigilancia actual de los mosquitos en estos sitios. Aunque los objetivos de esta tesis se centraron solamente en la identificación de la culicofauna en cementerios de la ciudad de Chihuahua, un estudio más amplio podría demostrar evidencia de que hay focos latentes de ETV en estos sitios, esperando a que se conjunten factores medioambientales y sociodemográficos para emerger. Por ejemplo, factores como la temperatura, la humedad, las lluvias, la densidad de población en la ciudad, además de la falta de educación en la reducción de criaderos artificiales, deben considerarse como factores importantes que pueden influir en la distribución de las ETV.

Los resultados del estudio multidisciplinario realizado en el periodo Abril – Diciembre de 2019 en la entidad, respaldan las siguientes conclusiones:

1. La presencia de mosquitos en cementerios de la ciudad de Chihuahua es una realidad, las condiciones medioambientales en estos sitios, son propicias para el desarrollo de su ciclo de vida; así como también, la falta de cultura con relación a la reducción de criaderos artificiales en esta zona del país, en donde la mayoría de las enfermedades transmitidas por mosquitos no son endémicas.
2. La biodiversidad de especies de mosquitos presentes en los cementerios de la ciudad de Chihuahua, que se lograron identificar mediante claves taxonómicas, sugieren una señal de alerta con respecto a ETV, debido a que se logró identificar a los principales vectores de arbovirus (DENV, ZIKV, CHIKV, VON, entre otros) como *Aedes aegypti*, *Culex quinquefasciatus*, principalmente. Por lo tanto, las personas que viven cerca de estos sitios podrían estar expuestas a estas enfermedades transmitidas por mosquitos, lo cual representa un importante problema de salud pública en la entidad.

Por otro lado, con base al análisis filogenético de las secuencias del VON en México y la frontera con EUA, se puede determinar que con el paso de los años, la variabilidad de este virus se ha incrementado. La presión evolutiva de algunas cepas circulantes de VON y posiblemente de otros flavivirus relacionados en México y la frontera con EUA es un estímulo ecológico potencial para el perfil genético diverso observado en las secuencias analizadas. Modelos como el propuesto por (Mann et al., 2013) acerca de la transmisión dinámica del VON entre México y EUA ofrecen una ruta novedosa que influye en la evolución sostenida del VON en el suroeste de EUA y el norte de México. El monitoreo de vectores, reservorios y aislamiento continuo de cepas y su caracterización fenotípica es de vital importancia para confirmar de manera adecuada sí existe o no, una transmisión dinámica en estas zonas.



10. RECOMENDACIONES Y PERSPECTIVAS

Los datos de esta investigación podrían usarse para desarrollar medidas de control y prevención pertinentes para enfermedades transmitidas por mosquitos en la ciudad de Chihuahua. Además, abre la puerta a nuevas investigaciones en áreas como: entomología médica y veterinaria, salud pública, epidemiología, inmunología, parasitología, virología, entre otras.

Es importante enfatizar que aún queda trabajo pendiente con el material biológico colectado e identificado mediante claves taxonómicas, para la realización de los códigos de barras de ADN de las diversas especies de mosquitos, así como también, la búsqueda de patógenos. Así mismo, el posible análisis del metagenoma de dichos ejemplares. Estos estudios podrían ayudar a visualizar el panorama actual de las ETV en la ciudad de Chihuahua.

11. BIBLIOGRAFÍA

Aguilar, A. G. (2006). *Los asentamientos humanos y el cambio climático en México. Un escenario futuro de vulnerabilidad regional*. Instituto de Geografía de la UNAM. México.

Abbas Ali, Anum Abbas and Mustapha Debboun (2017). “Zika Virus: Epidemiology, Vector and Sexual Transmission, Neurological Disorders and Vector Management- A Review”, *International Journal of Current Research*, 9, (10), 58721-58737.

Anderson, J. F., Andreadis, T. G., Vossbrinck, C. R., Tirrell, S., Wakem, E. M., French, R. A., Garmendia, A. E., & Van Kruiningen, H. J. (1999). Isolation of West Nile virus from mosquitoes, crows, and a Cooper's hawk in Connecticut. *Science*, 286(5448), 2331–2333. <https://doi.org/10.1126/science.286.5448.2331>



- Andreadis, T G, Capotosto, P. M., Shope, R. E., & Tirrell, S. J. (1994). Mosquito and arbovirus surveillance in Connecticut, 1991-1992. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 10(4), 556.
- Andreadis, Theodore G., Anderson, J. F., & Tirrell-Peck, S. J. (1998). Multiple Isolations of Eastern Equine Encephalitis and Highlands J Viruses from Mosquitoes (Diptera: Culicidae) during a 1996 Epizootic in Southeastern Connecticut. *Journal of Medical Entomology*, 35(3), 296–302. <https://doi.org/10.1093/jmedent/35.3.296>
- Andreadis, Theodore G., Armstrong, P. M., Anderson, J. F., & Main, A. J. (2014). Spatial-Temporal Analysis of Cache Valley Virus (Bunyaviridae: *Orthobunyavirus*) Infection in Anopheline and Culicine Mosquitoes (Diptera: Culicidae) in the Northeastern United States, 1997–2012. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 14(10), 763–773. <https://doi.org/10.1089/vbz.2014.1669>
- Armstrong, P. M., & Andreadis, T. G. (2010). Eastern equine encephalitis virus in mosquitoes and their role as bridge vectors. *Emerging Infectious Diseases*, 16(12), 1869–1874. <https://doi.org/10.3201/eid1612.100640>
- Azar, S. R., & Weaver, S. C. (2019). Vector competence: What has Zika virus taught us? In *Viruses* (Vol. 11, Issue 9, p. 867). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/v11090867>
- Bakonyi, T., Hubálek, Z., Rudolf, I., & Nowotny, N. (2005). Novel flavivirus or new lineage of West Nile virus, Central Europe. *Emerging Infectious Diseases*, 11(2), 225–231. <https://doi.org/10.3201/eid1102.041028>
- Beard, C. B., Eisen, R. J., Barker, C. M., Garofalo, J. F., Hahn, M., Hayden, M., Monaghan, A. J., Ogden, N. H., & Schramm, P. J. (2016). Ch. 5: Vectorborne Diseases. *The Impacts of Climate Change on Human Health in the United States: A Scientific Assessment*. <https://doi.org/10.7930/J0765C7V>
- Beasley, D. W. C., Davis, C. T., Estrada-Franco, J., Navarro-Lopes, R., Campomanes-Cortes, A., Tesh, R. B., Weaver, S. C., & Barrett, A. D. T. (2004). Genome sequence and attenuating mutations in Nile virus isolate from Mexico. *Emerging Infectious Diseases*, 10(12), 2221–2224. <https://doi.org/10.3201/eid1012.040647>
- Berntsen, B. T., James, A. A., & Christensen, B. M. (2000). Genetics of Mosquito Vector Competence. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64(1), 115–



137. <https://doi.org/10.1128/membr.64.1.115-137.2000>

- Belkin, B. J. N., Robert, X., & Sandra, J. (1965). Methods for the collection, rearing and preservation of mosquitoes. *Contributions of the American Entomological Institute, Volume 1*, 7–8.
- Bernkopf, H., Levine, S., & Nerson, R. (1953). Isolation of West Nile Virus in Israel. *The Journal of Infectious Diseases*, 93(3), 207–218. <http://www.jstor.org/stable/30089798>
- Berthet, F. X., Zeller, H. G., Drouet, M. T., Rauzier, J., Digoutte, J. P., & Deubel, V. (1997). Extensive nucleotide changes and deletions within the envelope glycoprotein genes of Euro-African West Nile viruses. *Journal of General Virology*, 78(9), 2293–2297. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-78-9-2293>
- Bickford, D., Lohman, D. J., Sodhi, N. S., Ng, P. K. L., Meier, R., Winker, K., Ingram, K. K., & Das, I. (2007). Cryptic species as a window on diversity and conservation. *Trends in Ecology & Evolution*, 22(3), 148–155. <https://doi.org/10.1016/J.TREE.2006.11.004>
- Bingham, A. M., Burkett-Cadena, N. D., Hassan, H. K., & Unnasch, T. R. (2016). Vector Competence and Capacity of *Culex erraticus* (Diptera: Culicidae) for Eastern Equine Encephalitis Virus in the Southeastern United States. *Journal of Medical Entomology*, 53(2), 473–476. <https://doi.org/10.1093/jme/tjv195>
- Blitvich, B. J., Fernandez-Salas, I., Contreras-Cordero, J. F., Marlenee, N. L., Gonzalez-Rojas, J. I., Komar, N., Gubler, D. J., Calisher, C. H., & Beaty, B. J. (2003). Serologic evidence of West Nile virus infection in horses, Coahuila State, Mexico. *Emerging Infectious Diseases*, 9(7), 853–856. <https://doi.org/10.3201/eid0907.030166>
- Bondre, V. P., Jadi, R. S., Mishra, A. C., Yergolkar, P. N., & Arankalle, V. A. (2007). West Nile virus isolates from India: Evidence for a distinct genetic lineage. *Journal of General Virology*, 88(3), 875–884. <https://doi.org/10.1099/vir.0.82403-0>
- Botha, E. M., Markotter, W., Wolfaardt, M., Paweska, J. T., Swanepoel, R., Palacios, G., Nel, L. H., & Venter, M. (2008). Genetic determinants of virulence in pathogenic lineage 2 West Nile virus strains. *Emerging Infectious Diseases*, 14(2), 222–230. <https://doi.org/10.3201/eid1402.070457>



- Carpenter, S. J., & La Casse, W. J. (1955). *Mosquitoes Of North America*. Univ of California Press.
- CDC. (2003). From the Centers for Disease Control and Prevention. Intrauterine West Nile virus infection--New York, 2002. *JAMA : The Journal of the American Medical Association*, 289(3), 295–296.
- CDC. (2016). *Mosquito species in which West Nile virus has been detected, United States, 1999-2016*.
- Centro Nacional de Programas Preventivos y Control de Enfermedades (CENAPRECE). (2017, 13 diciembre). Dirección del programa de enfermedades transmitidas por vectores. Recuperado 8 de junio de 2019, de <https://www.gob.mx/salud/cenaprece/acciones-y-programas/direccion-del-programa-de-enfermedades-transmitidas-por-vectores>
- R. W. Chamberlain, W. D. Sudia, T. H. Work, P. H. Coleman, V. F. Newhouse, J. G. Johnston, Jr., "Arbovirus studies in South Florida, with emphasis on Venezuelan Equine Encephalomyelitis Virus, *American Journal of Epidemiology*, Volume 89, Issue 2, February 1969, Pages 197–210, <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aje.a120929>
- Chancey, C., Grinev, A., Volkova, E., & Rios, M. (2015). The global ecology and epidemiology of west nile virus. In *BioMed Research International* (Vol. 2015). Hindawi Limited. <https://doi.org/10.1155/2015/376230>
- Cigarroa-Toledo, N., Blitvich, B. J., Cetina-Trejo, R. C., Talavera-Aguilar, L. G., Baak-Baak, C. M., Torres-Chablé, O. M., Hamid, M.-N., Friedberg, I., González-Martinez, P., Alonzo-Salomon, G., Rosado-Paredes, E. P., Rivero-Cárdenas, N., Reyes-Solis, G. C., Farfan-Ale, J. A., Garcia-Rejon, J. E., & Machain-Williams, C. (2016). Chikungunya Virus in Febrile Humans and *Aedes aegypti* Mosquitoes, Yucatan, Mexico. *Emerging Infectious Diseases*, 22(10), 1804–1807. <https://doi.org/10.3201/eid2210.152087>
- Correa-Morales, F., González-Acosta, C., Mejía-Zúñiga, D., Huerta, H., Pérez-Rentería, C., Vazquez-Pichardo, M., Ortega-Morales, A. I., Hernández-Triana, L. M., Salazar-Bueyes, V. M., & Moreno-García, M. (2019). Surveillance for Zika in Mexico: naturally infected mosquitoes in urban and semi-urban areas. *Pathogens*



and Global Health, 113(7), 309–314.

<https://doi.org/10.1080/20477724.2019.1706291>

- Crans WJ. A classification system for mosquito life cycles: life cycle types for mosquitoes of the northeastern United States. *Journal of Vector Ecology: Journal of the Society for Vector Ecology*. 2004 Jun;29(1):1-10.
- Cywinska, A., Hunter, F. F., & Hebert, P. D. N. (2006). Identifying Canadian mosquito species through DNA barcodes. *Medical and Veterinary Entomology*, 20(4), 413–424. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2915.2006.00653.x>
- Darsie Jr., R. F. & Ward, R. A. (2005). Identification and Geographical Distribution of the Mosquitoes of North America, North of Mexico. *Journal of Wildlife Diseases*, 43(4), 806–807. <https://doi.org/10.7589/0090-3558-43.4.806>
- Dávalos-Becerril, E., Correa-Morales, F., González-Acosta, C., Santos-Luna, R., Peralta-Rodríguez, J., Pérez-Rentería, C., Ordoñez-Álvarez, J., Huerta, H., Carmona-Perez, M., Díaz-Quiñonez, J. A., Mejía-Guevara, M. D., Sánchez-Tejeda, G., Kuri-Morales, P., González-Roldán, J. F., & Moreno-García, M. (2019). Urban and semi-urban mosquitoes of Mexico City: A risk for endemic mosquito-borne disease transmission. *PLoS ONE*, 14(3), 1–19. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0212987>
- De la Mora Covarrubias, A., & Olivas, A. G. (2007). Distribución geoespacial del mosquito *Culex quinquefasciatus* (diptera: culicidae) principal vector del Virus del oeste del nilo, en la zona urbana de ciudad Juárez, Chihuahua, México. *Revista Salud Pública y Nutrición*, 8(2), 1–13.
- De Rodaniche, E., & Galindo, P. (1963). Ecological observations on Ilh'eus Virus in the vicinity of Almirante. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 12(6), 924–928. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1963.12.924>
- Deardorff, E., Estrada-Franco, J. G., Brault, A. C., Navarro-Lopez, R., Campomanes-Cortes, A., Paz-Ramirez, P., Solis-Hernandez, M., Ramey, W. N., Davis, C. T., Beasley, D. W. C., Tesh, R. B., Barrett, A. D. T., & Weaver, S. C. (2006). Introductions of West Nile virus strains to Mexico. *Emerging Infectious Diseases*, 12(2), 314–318. <https://doi.org/10.3201/eid1202.050871>
- Deubel, V., Fiette, I., Gounon, P., Drouet, M. T., Khun, H., Huerre, M., Banet, C.,



- Malkinson, M., & Desprès, P. (2001). Variations in Biological Features of West Nile Viruses. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 951(1), 195–206. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2001.tb02697.x>
- Dirección General de Epidemiología (DGE). (2020). *Vigilancia Epidemiológica Semana 53, 2020*. <https://doi.org/10.21149/1004011>
- Duguma, D., Rueda, L. M., & Debboun, M. (2020). *Chapter 11 - Mosquito-Borne Diseases* (M. Debboun, M. R. Nava, & L. M. B. T.-M. Rueda Communities, and Public Health in Texas (eds.); pp. 319–337). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814545-6.00011-0>
- Elizondo-Quiroga, D., Medina-Sánchez, A., Sánchez-González, J. M., Eckert, K. A., Villalobos-Sánchez, E., Navarro-Zúñiga, A. R., Sánchez-Tejeda, G., Correa-Morales, F., González-Acosta, C., Arias, C. F., López, S., Del Ángel, R. M., Pando-Robles, V., & Elizondo-Quiroga, A. E. (2018). Zika Virus in Salivary Glands of Five Different Species of Wild-Caught Mosquitoes from Mexico. *Scientific Reports*, 8(1), 1–7. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-18682-3>
- Eritja, R., Ruiz-Arrondo, I., Delacour-Estrella, S., Schaffner, F., Álvarez-Chachero, J., Bengoa, M., Puig, M.-Á., Melero-Alcíbar, R., Oltra, A., & Bartumeus, F. (2019). First detection of *Aedes japonicus* in Spain: an unexpected finding triggered by citizen science. *Parasites & Vectors*, 12(1), 53. <https://doi.org/10.1186/s13071-019-3317-y>
- Ernst, K. C., Lindblade, K. A., Koech, D., Sumba, P. O., Kuwuor, D. O., John, C. C., & Wilson, M. L. (2009). Environmental, socio-demographic and behavioural determinants of malaria risk in the western Kenyan highlands: a case-control study. *Tropical Medicine & International Health*, 14(10), 1258–1265. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3156.2009.02370.x>
- Estrada-Franco, J. G., Navarro-Lopez, R., Beasley, D. W. C., Coffey, L., Carrara, A. S., Da Rosa, A. T., Clements, T., Wang, E., Ludwig, G. V., Campomanes Cortes, A., Paz Ramirez, P., Tesh, R. B., Barrett, A. D. T., & Weaver, S. C. (2003). West Nile Virus in Mexico: Evidence of Widespread Circulation since July 2002. In *Emerging Infectious Diseases* (Vol. 9, Issue 12, pp. 1604–1607). Centers for Disease Control and Prevention (CDC). <https://doi.org/10.3201/eid0912.030564>



- Felsenstein, J. (1985). Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*, 39(4), 783–791. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1985.tb00420.x>
- Folmer, O., Black, M., Hoeh, W., Lutz, R., & Vrijenhoek, R. (1994). DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 3(5), 294–299. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7881515>
- Foster, W. A., & Walker, E. D. (2019). *Chapter 15 - Mosquitoes (Culicidae)* (G. R. Mullen & L. A. B. T. M. and V. E. (Third E. Durden (eds.); pp. 261–325). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814043-7.00015-7>
- Fryxell, R. T. T., Freyman, K., Ulloa, A., Hendricks, B., Paulsen, D., Odoi, A., & Moncayo, A. (2015). Cemeteries are effective sites for monitoring la Crosse virus (LACv) and these environments may play a role in LACv infection. *PLoS ONE*, 10(4), 1–13. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0122895>
- Garcia-Rejon, J. E., Ulloa-Garcia, A., Cigarroa-Toledo, N., Pech-May, A., Machain-Williams, C., Cetina-Trejo, R. C., Talavera-Aguilar, L. G., Torres-Chable, O. M., Navarro, J. C., & Baak-Baak, C. M. (2018). Study of *Aedes aegypti* population with emphasis on the gonotrophic cycle length and identification of arboviruses: implications for vector management in cemeteries. *Revista Do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*, 60, e44. <https://doi.org/10.1590/S1678-9946201860044>
- Gargan, T. P., Clark, G. G., Dohm, D. J., Turell, M. J., & Bailey, C. L. (1988). Vector potential of selected North American mosquito species for Rift Valley fever virus. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 38(2), 440–446. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1988.38.440>
- Garza-Hernandez, J. A., Carmona-Aguirre, S. D., Garcia-Rejon, J. E., Tangudu, C. S., Cetina-Trejo, R. C., Pérez, M. A. R., Salazar, M. I., De Luna-Santillana, E. J., Machain-Williams, C., Blitvich, B. J., Doria-Cobos, G. L., & Laredo-Tiscareño, S. V. (2018). Surveillance for Flaviviruses Near the Mexico–U.S. Border: Co-circulation of Dengue Virus Serotypes 1, 2, and 3 and West Nile Virus in Tamaulipas, Northern Mexico, 2014–2016. *The American Journal of Tropical*



- Medicine and Hygiene*, 99(5), 1308–1317. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.18-0426>
- Goddard, L. B., Roth, A. E., Reisen, W. K., & Scott, T. W. (2002). Vector competence of California mosquitoes for West Nile virus. *Emerging Infectious Diseases*, 8(12), 1385–1391. <https://doi.org/10.3201/eid0812.020536>
- Gould, E., Pettersson, J., Higgs, S., Charrel, R., & de Lamballerie, X. (2017). Emerging arboviruses: Why today? *One Health (Amsterdam, Netherlands)*, 4, 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.onehlt.2017.06.001>
- Gratz, N. G. (1999). Emerging and resurging vector-borne diseases. *Annual Review of Entomology*, 44(1), 51–75. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.44.1.51>
- Gubler, D. J. (1998). Resurgent vector-borne diseases as a global health problem. *Emerging Infectious Diseases*, 4(3), 442–450. <https://doi.org/10.3201/eid0403.980326>
- Gubler, Duane J. (2002). The Global Emergence/Resurgence of Arboviral Diseases As Public Health Problems. *Archives of Medical Research*, 33(4), 330–342. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0188-4409\(02\)00378-8](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0188-4409(02)00378-8)
- Gubler, Duane J., & Vasilakis, N. (2016). The Arboviruses: Quo Vadis. *Preparation*.
- Guerrero-Sánchez, S., Cuevas-Romero, S., Nemeth, N. M., Trujillo-Olivera, M. T. J., Worwa, G., Dupuis, A., Brault, A. C., Kramer, L. D., Komar, N., & Estrada-Franco, J. G. (2011). West Nile virus infection of birds, Mexico. *Emerging Infectious Diseases*, 17(12), 2245–2252. <https://doi.org/10.3201/eid1712.110294>
- Gulia-Nuss, M., Elliot, A., Brown, M. R., & Strand, M. R. (2015). Multiple factors contribute to anautogenous reproduction by the mosquito *Aedes aegypti*. *Journal of Insect Physiology*, 82, 8–16. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2015.08.001>
- Harbach, R. E. (2007). The Culicidae (Diptera): A review of taxonomy, classification and phylogeny. In *Zootaxa* (Vol. 1668, Issue 1668, pp. 591–638). <https://doi.org/10.11646/zootaxa.1668.1.28>
- Hayes, C. G. (1989). West Nile fever. *The Arboviruses: Epidemiology and Ecology*, 5, 59–88.
- Hebert, P. D. N., Cywinska, A., Ball, S. L., & deWaard, J. R. (2003). Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 270(1512), 313–321.



<https://doi.org/10.1098/rspb.2002.2218>

- Heinemann, S. J., Belkin², J. N., Belkin, J. N., Bell, M. A., Chin, H., Fisher, E., Garrick, L. D., Hogue, C. L., Miller, J. G., Nielsen, L. T., Regal, P. J., Schick, R. X., Schroeder, D., Schroeder, G., Schroeder, K., Telford, S. R., Verity, D., & Zavortink, T. J. (1977). Collection Records of the Project "Mosquitoes of Middle America" 9. Mexico. In *Mosquito Systematics* (Vol. 9, Issue 4).
- Horsfall, W. E. (1955). Mosquitoes. Their Bionomics and Relation to Disease. *Mosquitoes. Their Bionomics and Relation to Disease*.
- Hubálek, Z., & Halouzka, J. (1999). West Nile fever - A reemerging mosquito-borne viral disease in Europe. *Emerging Infectious Diseases*, 5(5), 643–650. <https://doi.org/10.3201/eid0505.990505>
- Huerta, H., González-Roldán, J. F., Sánchez-Tejeda, G., Correa-Morales, F., Romero-Contreras, F. E., Cárdenas-Flores, R., Rangel-Martínez, M. L., Mata-Rivera, J. M., Siller-Martínez, J. de J., Vazquez-Prokopec, G. M., Manrique-Saide, P., Dzul-Manzanilla, F., Vázquez-Pichardo, M., Rosales-Jiménez, C., Torres-Rodríguez, M. de la L., Núñez-León, A., Torres-Longoria, B., López-Martínez, I., Ruiz-Matus, C., ... Díaz-Quiñónez, J. A. (2017). Detection of Zika virus in Aedes mosquitoes from Mexico. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 111(5), 328–331. <https://doi.org/10.1093/TRSTMH/TRX056>
- Ibáñez, S., & Martínez-Campos, C. (1994). *Clave para la identificación de larvas de mosquitos comunes en las áreas urbanas y suburbanas de la República Mexicana (Diptera: Culicidae)*.
- INEGI, I. N. de E. y G. (2013). Referencias geográficas y extensión territorial de México. *Geografía de México*, 17. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-13-S15-S5>
- Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI). (2018). *Anuario Geográfico - Chihuahua*. <https://www.inegi.org.mx/app/cuadroentidad/AnuarioGeografico/Chih/2018>
- Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI). (2019a). *Mapas Climatológicos*. Instituto Nacional de Estadística y Geografía. INEGI. <https://www.inegi.org.mx/temas/climatologia/>
- Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI). (2019b). *Mapas Fisiográficos*.



Instituto Nacional de Estadística y Geografía. INEGI.

<https://www.inegi.org.mx/temas/fisiografia/>

- Jeha, L. E., Sila, C. A., Lederman, R. J., Prayson, R. A., Isada, C. M., & Gordon, S. M. (2003). West Nile virus infection: A new acute paralytic illness. *Neurology*, *61*(1), 55–59. <https://doi.org/10.1212/01.WNL.0000073617.08185.0A>
- Jia, X. Y., Briese, T., Jordan, I., Rambaut, A., Chang Chi, H., MacKenzie, J. S., Hall, R. A., Scherret, J., & Lipkin, W. I. (1999). Genetic analysis of West Nile New York 1999 encephalitis virus. *Lancet*, *354*(9194), 1971–1972. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(99\)05384-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(99)05384-2)
- Jiménez, H. H. (2018). *Actualización de la Colección de Artrópodos con importancia médica (CAIM), Laboratorio de Entomología, InDRE*. <https://doi.org/10.15468/Y2RFF2>
- Juliano, S. A., O'Meara, G. F., Morrill, J. R., & Cutwa, M. M. (2002). Desiccation and thermal tolerance of eggs and the coexistence of competing mosquitoes. *Oecologia*, *130*(3), 458–469. <https://doi.org/10.1007/s004420100811>
- Karabatsos, N. (1985). Supplement to International Catalogue of Arboviruses Including Certain Other Viruses of Vertebrates. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, *27*(2_Part_2), 372. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1978.27.372>
- Kauffman, E., Payne, A., Franke, M., Schmid, M., Harris, E., & Kramer, L. (2017). Rearing of *Culex* spp. and *Aedes* spp. Mosquitoes. *BIO-PROTOCOL*, *7*(17). <https://doi.org/10.21769/BioProtoc.2542>
- Keyghobadi, N., Matrone, M. A., Ebel, G. D., Kramer, L. D., & Fonseca, D. M. (2003). Microsatellite loci from the northern house mosquito (*Culex pipiens*), a principal vector of West Nile virus in North America. *Molecular Ecology Notes*, *4*(1), 20–22. <https://doi.org/10.1046/j.1471-8286.2003.00557.x>
- Kimura, M. (1980). A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*, *16*(2), 111–120. <https://doi.org/10.1007/BF01731581>
- Kline, D. L. (2006). *Book Review: Identification and Geographical Distribution of the Mosquitoes of North America, North of Mexico*. <https://digitalcommons.unl.edu/usdaarsfacpub><https://digitalcommons.unl.edu/usd>



aarsfacpub/356

- Knight, K. L., & Stone, A. (1977). A catalog of the mosquitoes of the world (Diptera: Culicidae). In *The Thomas Say Foundation* (Vol. 6). Entomological Society of America.
- Kress, W. J., & Erickson, D. L. (2012). DNA Barcodes: Methods and Protocols. In *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* (Vol. 858, pp. 3–8). https://doi.org/10.1007/978-1-61779-591-6_1
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., & Tamura, K. (2018). MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*, 35(6). <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>
- Kuno, G., Mackenzie, J. S., Junglen, S., Hubálek, Z., Plyusnin, A., & Gubler, D. J. (2017). Vertebrate reservoirs of arboviruses: Myth, synonym of amplifier, or reality? In *Viruses* (Vol. 9, Issue 7). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/v9070185>
- Lanciotti, R. S., Ebel, G. D., Deubel, V., Kerst, A. J., Murri, S., Meyer, R., Bowen, M., McKinney, N., Morrill, W. E., Crabtree, M. B., Kramer, L. D., & Roehrig, J. T. (2002). Complete genome sequences and phylogenetic analysis of West Nile virus strains isolated from the United States, Europe, and the Middle East. *Virology*, 298(1), 96–105. <https://doi.org/10.1006/viro.2002.1449>
- Lawrie, C. H., Uzcátegui, N. Y., Gould, E. A., & Nuttall, P. A. (2004). Ixodid and Argasid Tick Species and West Nile Virus. *Emerging Infectious Diseases*, 10(4), 653–657. <https://doi.org/10.3201/eid1004.030517>
- Ledesma, N., & Harrington, L. (2011). Mosquito vectors of dog heartworm in the United States: Vector status and factors influencing transmission efficiency. *Topics in Companion Animal Medicine*, 26(4), 178–185. <https://doi.org/10.1053/j.tcam.2011.09.005>
- Leisnham, P. T. (2009). *Spatial and temporal patterns of coexistence between competing*. 160(2), 343–352. <https://doi.org/10.1007/s00442-009-1305-1>
- Leisnham, P. T., & Juliano, S. A. (2012). Impacts of Climate, Land Use, and Biological Invasion on the Ecology of Immature Aedes Mosquitoes: Implications for La Crosse Emergence. *EcoHealth*, 9(2), 217–228. <https://doi.org/10.1007/s10393-012-0773-7>



- Liu, H., Li, M. H., Zhai, Y. G., Meng, W. S., Sun, X. H., Cao, Y. X., Fu, S. H., Wang, H. Y., Xu, L. H., Tang, Q., & Liang, G. D. (2010). Banna virus, China, 1987-2007. *Emerging Infectious Diseases*, 16(3), 514–517. <https://doi.org/10.3201/eid1603.091160>
- Loroño-Pino, M. A., Blitvich, B. J., Farfán-Ale, J. A., Puerto, F. I., Blanco, J. M., Marlenee, N. L., Rosado-Paredes, E. P., García-Rejón, J. E., Gubler, D. J., Calisher, C. H., & Beaty, B. J. (2003). Serologic evidence of West Nile virus infection in horses, Yucatan State, Mexico. *Emerging Infectious Diseases*, 9(7), 857–859. <https://doi.org/10.3201/eid0907.030167>
- Luis Arredondo-García, J., Gabriela Aguilar-López Escalera, C., José Aguilar Lugo-Gerez, J., Osnaya-Romero, N., Pérez-Guillé, G., & Medina-Cortina, H. (2020). Epidemiological panorama of dengue in Mexico 2000-2019. *Rev Latin Infect Pediatr*, 33(2), 78–83. <https://doi.org/10.35366/94418>
- Mann, B. R., McMullen, A. R., Guzman, H., Tesh, R. B., & Barrett, A. D. T. (2013). Dynamic transmission of West Nile virus across the United States–Mexican border. *Virology*, 436(1), 75–80. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2012.10.023>
- Marberg, K., Goldblum, N., Sterk, V. V., Jasinska-klingsberg, W., & Klingsberg, M. A. (1956). The natural history of west nile fever I. Clinical observations during an epidemic in Israel. *American Journal of Epidemiology*, 64(3), 259–269. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aje.a119838>
- Martini, E. C. W. (1935). *Los mosquitos de México* (Issue 1). Departamento de Salubridad Pública.
- May, F. J., Davis, C. T., Tesh, R. B., & Barrett, A. D. T. (2011). Phylogeography of West Nile Virus: from the Cradle of Evolution in Africa to Eurasia, Australia, and the Americas. *Journal of Virology*, 85(6), 2964–2974. <https://doi.org/10.1128/jvi.01963-10>
- Mayer, S. V, Tesh, R. B., & Vasilakis, N. (2017). The emergence of arthropod-borne viral diseases: A global prospective on dengue, chikungunya and zika fevers. *Acta Tropica*, 166, 155–163. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2016.11.020>
- McGraw, E. A., & O'Neill, S. L. (2013). Beyond insecticides: new thinking on an ancient problem. *Nature Reviews Microbiology*, 11(3), 181–193.



<https://doi.org/10.1038/nrmicro2968>

- McLean, R. G., Ubico, S. R., Bourne, D., & Komar, N. (2002). West Nile virus in livestock and wildlife. In *Current Topics in Microbiology and Immunology* (Vol. 267, pp. 271–308). *Curr Top Microbiol Immunol*. https://doi.org/10.1007/978-3-642-59403-8_14
- Medina, G. E., Sandoval, E. A., Rentería, T. B., López, G., De La Mora, A., & Pujol, L. C. (2008). *West Nile Virus detection by RT-PCR from mosquitoes in a locality of Baja California, Mexico* (Vol. 50). www.medigraphic.com
- Mitchell, C. J., Haramis, L. D., Karabatsos, N., Smith, G. C., & Starwalt, V. J. (1998). Isolation of La Crosse, Cache Valley, and Potosi Viruses from Aedes Mosquitoes (Diptera: Culicidae) Collected at Used-Tire Sites in Illinois during 1994-1995. *Journal of Medical Entomology*, 35(4), 573–577. <https://doi.org/10.1093/jmedent/35.4.573>
- Mora-Covarrubias, A. de la, Jiménez-Vega, F., & Treviño-Aguilar, S. M. (2010). Distribución geoespacial y detección del virus del dengue en mosquitos Aedes (Stegomyia) aegypti de Ciudad Juárez, Chihuahua, México. *Salud Pública de México*, 52(2), 127–133. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0036-36342010000200004&lng=es&nrm=iso&tlng=es
- Nacional Academia de Ciencias. (2016). *Global Health Impacts of Vector-Borne Diseases* (A. Mack (ed.)). National Academies Press. <https://doi.org/10.17226/21792>
- Nei, M., & Kumar, S. (2000). *Molecular Evolution and Phylogenetics*. Oxford University Press. <https://books.google.com.mx/books?id=hcPSag2pn9IC>
- Nyamah, M. A., Sulaiman, S., & Omar, B. (2011). Field observation on the efficacy of *Toxorhynchites splendens* (Wiedemann) as a biocontrol agent against *Aedes albopictus* (Skuse) larvae in a cemetery. *Tropical Biomedicine*, 28(2), 312–319.
- O'Meara, G. F., Gettman, A. D., Evans, L. F., & Scheel, F. D. (1992). Invasion of cemeteries in Florida by *Aedes albopictus*. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 8(1), 1–10.
- O'Meara, George F, & Edman, J. D. (1975). Autogenous egg production in the salt-

- marsh mosquito, *Aedes Taeniorhynchus*. *The Biological Bulletin*, 149(2), 384–396.
<https://doi.org/10.2307/1540534>
- OMS. (2017). *Enfermedades Transmitidas por Vector (ETV)*.
<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/vector-borne-diseases>
- Orduño-Servín, G. (2014). Hacia una historia cultural de los cementerios mexicanos.
Cambios y Permanencias, 5, 411–426.
- Ortega-Morales, A. I., & Nava, M. R. (2020). *Chapter 9 - Mosquito Species of Neighboring States of Mexico* (M. Debboun, M. R. Nava, & L. M. B. T.-M. Rueda Communities, and Public Health in Texas (eds.); pp. 279–306). Academic Press.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814545-6.00009-2>
- Ortega-Morales, A. I., Siller-Rodríguez, Q. K., Garza-Hernández, J. A., Huerta-Jiménez, H., López-Hernández, J., González-Acosta, C., & Correa-Morales, F. (2019). *Distribucion of mosquito species (Diptera: Culicidae) vectors of arboviruses in Mexico*. www.mosquito-taxonomic-inventory.info
- Pacheco Hernández, M. de L., Reséndiz Martínez, J. F., & Arriola Padilla, V. J. (2019). Organismos entomopatógenos como control biológico en los sectores agropecuario y forestal de México: una revisión. *Revista Mexicana de Ciencias Forestales*, 10(56), 4–32. <https://doi.org/10.29298/rmcf.v10i56.496>
- Palermo, P. M., De La Mora-Covarrubias, A., Jimenez-Vega, F., & Watts, D. M. (2019a). Serological Evidence of Dengue and West Nile Virus Human Infection in Juarez City, Mexico. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 19(2), 134–141.
<https://doi.org/10.1089/vbz.2018.2302>
- Palermo, P. M., De La Mora-Covarrubias, A., Jimenez-Vega, F., & Watts, D. M. (2019b). Serological Evidence of Dengue and West Nile Virus Human Infection in Juarez City, Mexico. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 19(2), 134–141.
<https://doi.org/10.1089/vbz.2018.2302>
- Petersen, L. R., & Roehrig, J. T. (2001). West Nile Virus West Nile Virus: A Reemerging Global Pathogen. In *Emerging Infectious Diseases* (Vol. 7, Issue 4).
- Pfeffer, M., & Dobler, G. (2010). Emergence of zoonotic arboviruses by animal trade and migration. In *Parasites and Vectors* (Vol. 3, Issue 1). Parasit Vectors.
<https://doi.org/10.1186/1756-3305-3-35>



- Pitzer, J. B., Byford, R. L., Vuong, H. B., Steiner, R. L., Creamer, R. J., & Caccamise, D. F. (2009). Potential Vectors of West Nile Virus in a Semiarid Environment: Doña Ana County, New Mexico. *Journal of Medical Entomology*, *46*(6), 1474–1482. <https://doi.org/10.1603/033.046.0634>
- Rappole, J. H., Derrickson, S. R., & Hubálek, Z. (2000). Migratory birds and spread of West Nile virus in the Western Hemisphere. In *Emerging Infectious Diseases* (Vol. 6, Issue 4, pp. 319–328). Centers for Disease Control and Prevention (CDC). <https://doi.org/10.3201/eid0604.000401>
- Ratnasingham, S., & Hebert, P. D. N. (2007). bold: The Barcode of Life Data System (<http://www.barcodinglife.org>). *Molecular Ecology Notes*, *7*(3), 355–364. <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2007.01678.x>
- Reinert, J. F., Harbach, R. E., & Kitching, I. J. (2004). Phylogeny and classification of Aedini (Diptera: Culicidae), based on morphological characters of all life stages. *Zoological Journal of the Linnean Society*, *142*(3), 289–368. <https://doi.org/10.1111/j.1096-3642.2004.00144.x>
- Reisen, W. K., Fang, Y., & Martinez, V. M. (2005). Avian host and mosquito (Diptera: Culicidae) vector competence determine the efficiency of West Nile and St. Louis encephalitis virus transmission. *Journal of Medical Entomology*, *42*(3), 367–375. <https://doi.org/10.1093/jmedent/42.3.367>
- Reisen, W., Lothrop, H., Chiles, R., Madon, M., Cossen, C., Woods, L., Husted, S., Kramer, V., & Edman, J. (2004). West Nile virus in California. *Emerging Infectious Diseases*, *10*(8), 1369–1378. <https://doi.org/10.3201/eid1008.040077>
- Rodríguez Domínguez, J. (2002). Las enfermedades transmitidas por vector en México. *Revista de La Facultad de Medicina, UNAM*, *45*(3), 126–141.
- Saitou, N., & Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, *4*(4), 406–425. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040454>
- Scherret, J. H., Poidinger, M., Mackenzie, J. S., Broom, A. K., Deubel, V., Lipkin, W. I., Briese, T., Gould, E. A., & Hall, R. A. (2001). The Relationships between West Nile and Kunjin Viruses. *Emerging Infectious Diseases*, *7*(4), 697–705. <https://doi.org/10.3201/eid0704.010418>



- Scholte, E. J., Knols, B. G. J., Samson, R. A., & Takken, W. (2004). Entomopathogenic fungi for mosquito control: A review. In *Journal of Insect Science* (Vol. 4). Library of the University of Arizona. <https://doi.org/10.1093/jis/4.1.19>
- Secretaría de Economía (SE). (2018). *Información Económica y Estatal - Chihuahua*.
- Secretaría de Salud (SSA). (2019). *Boletín Epidemiológico Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica Sistema Único de Información | Secretaría de Salud | Gobierno | gob.mx*. 01 Noviembre. https://www.gob.mx/salud/documentos/_-boletinepidemiologico-sistema-nacional-de-vigilancia-epidemiologica-sistema-unico-de-informacion-186989
- Sejvar, J. J. (2003). West Nile virus: An historical overview. In *Ochsner Journal* (Vol. 5, Issue 3, pp. 6–10). Ochsner Clinic, L.L.C. and Alton Ochsner Medical Foundation. [/pmc/articles/PMC3111838/](https://pmc/articles/PMC3111838/)
- Sejvar, J. J., Haddad, M. B., Tierney, B. C., Campbell, G. L., Marfin, A. A., Van Gerpen, J. A., Fleischauer, A., Leis, A. A., Stokic, D. S., & Petersen, L. R. (2003). Neurologic Manifestations and Outcome of West Nile Virus Infection. *Journal of the American Medical Association*, 290(4), 511–515. <https://doi.org/10.1001/jama.290.4.511>
- Service, M. W. (2012). *Medical Entomology for Students*. Cambridge University Press. https://books.google.com.mx/books?id=8U5i8C_I8ykC
- Shenoy, R. K. (2008). Clinical and pathological aspects of filarial lymphedema and its management. *The Korean Journal of Parasitology*, 46(3), 119–125. <https://doi.org/10.3347/kjp.2008.46.3.119>
- Smithburn, K. C., Hughes, T. P., Burke, A. W., & Paul, J. H. (1940). A Neurotropic Virus Isolated from the Blood of a Native of Uganda 1. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, s1-20(4), 471–492. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1940.s1-20.471>
- Souza-Neto, J. A., Powell, J. R., & Bonizzoni, M. (2019). *Aedes aegypti* vector competence studies: A review. In *Infection, Genetics and Evolution* (Vol. 67, pp. 191–209). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2018.11.009>
- Stecher, G., Tamura, K., & Kumar, S. (2020). Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) for macOS. *Molecular Biology and Evolution*, 37(4), 1237–1239.



<https://doi.org/10.1093/molbev/msz312>

- Sudia, W. D., Z, L. F., Newhouse, V. F., B, R. S., & Chlisher, C. H. (1975). Arbovirus vector ecology studies in Mexico during the 1972 venezuelan equine encephalitis outbreak. *American Journal of Epidemiology*, 101(1), 51–58. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aje.a112070>
- Sutherst, R. W. (2004). Global change and human vulnerability to vector-borne diseases. *Clinical Microbiology Reviews*, 17(1), 136–173. <https://doi.org/10.1128/cmr.17.1.136-173.2004>
- Takken, W., & Verhulst, N. O. (2013). Host Preferences of Blood-Feeding Mosquitoes. *Annual Review of Entomology*, 58(1), 433–453. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-120811-153618>
- Tao, S., Zhang, H., Yang, D., Wang, H., Liu, Q., Zhang, Y., Yang, W., Cao, Y., Xu, L., He, Y., & Chen, B. (2003). [Investigation of Arboviruses in Lancang river downstream area in Yunnan province]. *Zhonghua Shi Yan He Lin Chuang Bing Du Xue Za Zhi = Zhonghua Shiyang He Linchuang Bingduxue Zazhi = Chinese Journal of Experimental and Clinical Virology*, 17 4, 322–326.
- Téllez, I., Calderón, O., Franco-Paredes, C., & Del Río, C. (2006). *El virus del Oeste del Nilo: una realidad en México* (Vol. 142, Issue 6). www.anmm.org.mx
- Tolle, M. A. (2009). Mosquito-borne Diseases. *Current Problems in Pediatric and Adolescent Health Care*, 39(4), 97–140. <https://doi.org/10.1016/J.CPPEDS.2009.01.001>
- Turell, M. J., Dohm, D. J., Sardelis, M. R., O'guinn, M. L., Andreadis, T. G., & Blow, J. A. (2005). An Update on the Potential of North American Mosquitoes (Diptera: Culicidae) to Transmit West Nile Virus. *Journal of Medical Entomology*, 42(1), 57–62. <https://doi.org/10.1093/jmedent/42.1.57>
- Ulloa, A., Ferguson, H. H., Méndez-Sánchez, J. D., Danis-Lozano, R., Casas-Martínez, M., Bond, J. G., García-Zebadúa, J. C., Orozco-Bonilla, A., Juárez-Ordaz, J. A., Farfan-Ale, J. A., García-Rejón, J. E., Rosado-Paredes, E. P., Edwards, E., Komar, N., Hassan, H. K., Unnasch, T. R., & Rodríguez-Pérez, M. A. (2009). West Nile virus activity in mosquitoes and domestic animals in Chiapas, México. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 9(5), 555–560.



<https://doi.org/10.1089/vbz.2008.0087>

Environmental Protection Agency (EPA). (2021, 28 enero). Mosquito Life Cycle.

Recuperado 12 de abril de 2021, de

<https://www.epa.gov/mosquitocontrol/mosquito-life-cycle>

Valzania, L., Mattee, M. T., Strand, M. R., & Brown, M. R. (2019). Blood feeding activates the vitellogenic stage of oogenesis in the mosquito *Aedes aegypti* through inhibition of glycogen synthase kinase 3 by the insulin and TOR pathways.

Developmental Biology, 454(1), 85–95.

<https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2019.05.011>

Vannavong, N., Seidu, R., Stenström, T. A., Dada, N., & Overgaard, H. J. (2017).

Effects of socio-demographic characteristics and household water management on *Aedes aegypti* production in suburban and rural villages in Laos and Thailand.

Parasites and Vectors, 10(1), 170. <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2107-7>

Vargas, L. (1941). *Anopheles pseudopunctipennis willardi*, n. var. (Dipt. Culicidae).

Revista de la Sociedad Mexicana de Historia Natural, 2(1), 47-49 pp.

<https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19422901484>

Vargas, Luis., & Martínez Palacios, A. (1956). *Anofelinos mexicanos: taxonomía y distribución*. Secretaría de Salubridad y Asistencia, Comisión Nacional para la Erradicación del Paludismo.

Vargas, Luis. (1956). Especies y distribución de mosquitos mexicanos no Anofelinos (Insecta, Diptera). *Revista Del Instituto de Salubridad y Enfermedades Tropicales*, 16(1), 19–36.

Vázquez, A., Sánchez-Seco, M. P., Ruiz, S., Molero, F., Hernández, L., Moreno, J., Magallanes, A., Tejedor, C. G., & Tenorio, A. (2010). Putative new lineage of West Nile virus, Spain. *Emerging Infectious Diseases*, 16(3), 549–552. <https://doi.org/10.3201/eid1603.091033>

Vezzani, D., & Albicocco, A. P. (2009). The effect of shade on the container index and pupal productivity of the mosquitoes *Aedes aegypti* and *Culex pipiens* breeding in artificial containers. *Medical and Veterinary Entomology*, 23(1), 78–84. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2915.2008.00783.x>

Vezzani, Darío. (2007). Review: Artificial container-breeding mosquitoes and



- cemeteries: A perfect match. In *Tropical Medicine and International Health* (Vol. 12, Issue 2, pp. 299–313). <https://doi.org/10.1111/j.1365-3156.2006.01781.x>
- Vezzani, Darío, Velázquez, S. M., Soto, S., & Schweigmann, N. J. (2001). Environmental Characteristics of the Cemeteries of Buenos Aires City (Argentina) and Infestation Levels of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 96(4), 467–471. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762001000400005>
- Weaver, S. C., & Barrett, A. D. T. (2004). Transmission cycles, host range, evolution and emergence of arboviral disease. *Nature Reviews Microbiology*, 2(10), 789–801. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1006>
- Weaver, S. C., & Reisen, W. K. (2010). Present and future arboviral threats. In *Antiviral Research* (Vol. 85, Issue 2, pp. 328–345). Antiviral Res. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2009.10.008>
- Wilkerson, R. C., Linton, Y., Fonseca, D. M., & Schultz, T. R. (2015). *Making Mosquito Taxonomy Useful: A Stable Classification of Tribe Aedini that Balances Utility with Current Knowledge of Evolutionary Relationships*. 1–26. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0133602>
- Wilson, A. J., Morgan, E. R., Booth, M., Norman, R., Perkins, S. E., Hauffe, H. C., Mideo, N., Antonovics, J., McCallum, H., & Fenton, A. (2017). What is a vector? *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 372(1719). <https://doi.org/10.1098/rstb.2016.0085>
- Xia, H., Wang, Y., Atoni, E., Zhang, B., & Yuan, Z. (2018). Mosquito-Associated Viruses in China. In *Virologica Sinica* (Vol. 33, Issue 1, pp. 5–20). Science Press. <https://doi.org/10.1007/s12250-018-0002-9>
- Xiao, J.-H., Wang, N.-X., Li, Y.-W., Murphy, R. W., Wan, D.-G., Niu, L.-M., Hu, H.-Y., Fu, Y.-G., & Huang, D.-W. (2010). Molecular Approaches to Identify Cryptic Species and Polymorphic Species within a Complex Community of Fig Wasps. *PLoS ONE*, 5(11), e15067. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0015067>