



El Colegio de la Frontera Sur

Detección Molecular de Arbovirus Transmitidos por Mosquitos Hematófagos en Poblaciones de Coatíes (*Nasua narica*) en el Estado de Quintana Roo.

Tesis

Presentada como requisito parcial para optar al grado de Maestro en Ciencias en Recursos Naturales y Desarrollo Rural

Por

Ricardo Javier Morales Flores

2017



El Colegio de la Frontera Sur

San Francisco de Campeche, Campeche, 12 de junio de 2017.

Las personas abajo firmantes, miembros del jurado examinador de: Ricardo Javier Morales Flores, hacemos constar que hemos revisado y aprobado la tesis titulada:

Detección Molecular de Arbovirus Transmitidos por Mosquitos Hematófagos en Poblaciones de Coatíes (*Nasua narica*) en el Estado de Quintana Roo.

Para obtener el grado de **Maestro en Ciencias en Recursos Naturales y Desarrollo Rural**

Nombre

Firma

Director Dr. Manuel Weber Rodríguez.

Asesora Dra. Ariane Lilianne Jeanne Dor.

Asesor Dr. Carlos Machain Williams.

Sinodal adicional Dr. Juan Carlos Pérez Jiménez.

Sinodal adicional Dra. Gabriela García Marmolejo.

Sinodal adicional Dra. Salomé Cabrera Romo.

Sinodal suplente Dra. Griselda Escalona Segura.

DEDICATORIA

A Rosa María Flores Acevedo.

“No hay nada fuera de ti que te pueda permitir
ser mejor, más fuerte, más rico, más rápido o más inteligente.
Todo está dentro de ti. Todo existe en ti.
No busques nada fuera de ti mismo”
Miyamoto Musashi

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca económica otorgada durante dos años para realizar mis estudios de maestría y por el apoyo de beca – tesis para el financiamiento parcial de los trabajos de campo.

Al Dr. Manuel Weber por su apoyo incondicional como director de tesis y por compartir sus conocimientos y amistad. También por su invaluable apoyo en las gestiones para el otorgamiento de financiamiento parcial para el trabajo de campo a través del Departamento de Conservación de la Biodiversidad de El Colegio de la Frontera Sur, Unidad Campeche.

A la Dra. Ariane Dor por su apoyo como asesora de tesis.

Al Dr. Carlos Machain Williams por su apoyo como asesor de tesis y por brindarme la oportunidad de trabajar en laboratorio de Arbovirología del Centro de Investigaciones Regionales Dr. Hideyo Noguchi de la Universidad Autónoma de Yucatán, otorgándome todas las facilidades necesarias para realizar mi trabajo de campo y de laboratorio.

Un especial agradecimiento a todos los integrantes del laboratorio de Arbovirología, por su calidez y apoyo incondicional en todo momento, especialmente al Dr. Julián García Rejón, Lourdes Talavera, Nohemí Cigarroa, Rosa Cetina, Carlos Baak, Wilberth Chi, Julio Tzuc, Naivy Gamboa, Osvaldo Torres y Karla Castillo.

A mis amigos Paulina Aguilar Martínez, José Alonso May Uicab, José Pablo Trejo, Víctor Alba y Ana Lilia Bolio Sosa por su invaluable apoyo en los trabajos de campo, sin ustedes, hubiese estado perdido.

A los Dres. Gabriela Lara, Ana Maza, Josué Garduño, M.I.A Elba López Castro y al Ing. Alberto Gil por todas las facilidades otorgadas.

A las Dras. Gabriela García Marmolejo y Salomé Cabrera Romo por su invaluable e incondicional apoyo para en la revisión de mi tesis y amistad.

A mi padre y colega Ricardo Morales Núñez por dejar sus proyectos laborales para apoyarme a concluir mis estudios de maestría, sus consejos y experiencia para no perder la calma en los momentos más difíciles.

A Ana Lilia Bolio Sosa, por tu incondicional apoyo en todo momento y que tan poco tiempo, junto con mi padre se han vuelto pilares importantes en mi vida.

ÍNDICE

DEDICATORIA.....	I
AGRADECIMIENTOS	II
ÍNDICE	III
ÍNDICE DE CUADROS.	IV
ÍNDICE DE FIGURAS.	V
1. Resumen.....	VII
2. Introducción.	1
3. Métodos.	166
3.1. Sitios de estudio.	166
3.2. Diseño de muestreo en mosquitos hematófagos.	20
3.2.1. Colecta de mosquitos hematófagos.	20
3.2.2. Diseño de muestreo en coatíes.	22
3.3. Análisis de laboratorio.	24
3.4. Parámetros de infección en coatíes.....	27
3.5. Medidas de asociación epidemiológica (riesgo relativo)	27
3.6. Análisis estadísticos.	29
4. Resultados	34
4.1. Mosquitos Hematófagos	34
4.1.1. Esfuerzo de muestreo y modelos de acumulación de especies.....	34
4.1.2. Análisis de diversidad de mosquitos hematófagos	35
4.1.3. Caracterización de la muestra de mosquitos hematófagos.....	37
4.2. Coatíes	40
4.2.1. Abundancia relativa	40
4.2.2. Caracterización de la muestra de coatíes.....	41
4.2.3. Evaluación general del estado de salud.	41
4.3. Resultados de RT-PCR.	43
4.4. Prevalencias de Infección.....	48
4.5. Secuencias genéticas	48
4.6. Medidas de asociación epidemiológica (riesgo relativo)	50
5. Discusión.	53
6. Conclusiones	63
7. Referencias.....	64
8. Anexos.....	84

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Taxonomía de los arbovirus hasta el género.....	3
Cuadro 2. Arbovirus (familias <i>Flaviviridae</i> , <i>Togaviridae</i> y <i>Bunyaviridae</i>), vectores, hospederos vertebrados, ecología, distribución mundial y presencia en México.	7
Cuadro 3. Fórmulas para obtener el esfuerzo de muestreo total por métodos de colecta de mosquitos hematófagos.	21
Cuadro 4. Iniciadores específicos para las familias <i>Bunyaviridae</i> , <i>Flaviviridae</i> y <i>Togaviridae</i>	25
Cuadro 5. Condiciones de temperatura utilizadas para la amplificación del ADN de las reacciones para las familias <i>Bunyaviridae</i> , <i>Flaviviridae</i> y <i>Togaviridae</i>	26
Cuadro 6. Interpretación del valor de riesgo relativo (rr).	33
Cuadro 7. Modelos de acumulación de especies de mosquitos hematófagos	34
Cuadro 8. Indicadores de diversidad de especies de mosquitos hematófagos	36
Cuadro 9. Abundancia absoluta y relativa de especies de mosquitos hematófagos.	36
Cuadro 10. Abundancia de mosquitos hematófagos colectados por sitio y época.	37
Cuadro 11. Abundancia de mosquitos hematófagos colectados por método de aspirado por sitio.	38
Cuadro 12. Abundancia de mosquitos hematófagos colectados por método trampas Magoon por sitio.....	39
Cuadro 13. Especies de mosquitos hematófagos asociados a trampas Magoon por sitio	40
Cuadro 14. Índice de abundancia relativa de coatíes por sitio y época.....	41
Cuadro 15. Prevalencia de lesiones externas en coatíes en sitio A por época..	42
Cuadro 16. Prevalencia de lesiones externas en coatíes en sitio B por época..	43
Cuadro 17. Riesgo relativo para la ocurrencia de arbovirus en coatíes por sitio de estudio	52

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Virión y estructura del genoma de los virus del género <i>Flavivirus</i> , familia <i>Flaviviridae</i>	¡Error! Marcador no definido.
Figura 2. Virión y estructura del genoma de los virus del género <i>Orthobunyavirus</i> , familia <i>Bunyaviridae</i>	5
Figura 3. Virión y estructura del genoma de los virus del género <i>Alphavirus</i> , familia <i>Togaviridae</i>	6
Figura 4. Ubicación geográfica de los sitios turísticos de estudio en el Estado de Quintana Roo.....	17
Figura 5. Mapa del Sitio A. Ubicación de trampas Magoon, sitios de captura de coatíes y superficie de áreas verdes, cuerpos de agua y construcciones.....	18
Figura 6. Mapa del Sitio B. Ubicación de trampas Magoon, sitios de captura de coatíes y superficie de áreas verdes, cuerpos de agua y construcciones.....	19
Figura 7. Trampa Magoon modificada para coleccionar mosquitos hematofagos, usando como cebo vivo a un ejemplar de coatí (<i>Nasua narica</i>).....	20
Figura 8. Imagen satelital del Sitio A, mostrando el grado de urbanización en un buffer de 10 km ²	28
Figura 9. Imagen satelital del Sitio B, mostrando el grado de urbanización en un buffer de 10 km ²	28
Figura 10. Curva de acumulación de especies (rarefacción) de mosquitos hematofagos observada y estimada.....	35
Figura 11. Gel de agarosa teñido con bromuro de etidio, mostrando amplicones obtenidos a partir el análisis de RT-PCR para la familia <i>Bunyaviridae</i> (Kuno Et al. 1996), en conglomerados de muestras de suero de coatíes.....	44
Figura 12. Gel de agarosa teñido con bromuro de etidio, mostrando amplicones obtenidos a partir el análisis de RT-PCR para la familia <i>Flaviviridae</i> (Scaramozzino et al. 2001), en conglomerados de muestras de suero de coatíes.....	44
Figura 13. Gel de agarosa teñido con bromuro de etidio, mostrando amplicones obtenidos a partir el análisis de RT-PCR para la familia <i>Bunyaviridae</i> (Kuno Et al. 1996), en muestras de suero de coatíes en el sitio A.....	45

Figura 14. Gel de agarosa teñido con bromuro de etidio, mostrando amplicones obtenidos a partir el análisis de RT-PCR para la familia *Bunyaviridae* (Kuno Et al. 1996), en muestras de suero de coatíes en el sitio B46

Figura 15. Gel de agarosa teñido con bromuro de etidio, mostrando amplicones obtenidos a partir el análisis de RT-PCR para la familia *Flaviviridae* (Scaramozzino et al. 2001), en muestras de suero de coatíes en el sitio A47

Figura 16. Gel de agarosa teñido con bromuro de etidio, mostrando amplicones obtenidos a partir el análisis de RT-PCR para la familia *Flaviviridae* (Scaramozzino et al. 2001), en muestras de suero de coatíes en el sitio B47

Figura 17. Análisis filogenético de las secuencias genéticas correspondientes al virus del serogrupo Bunyamwera.....49

Figura 18. Análisis filogenético de las secuencias genéticas correspondientes al virus del Oeste del Nilo50

Figura 19. Tablas de contingencia de los factores de riesgo asociados a los sitios de estudio y a las poblaciones de coatíes.52

1. Resumen

La tendencia creciente de desarrollos turísticos ha modificado, entre otros procesos ecológicos, las dinámicas poblacionales de fauna silvestre, favoreciendo aquellas especies de hábitos sinantrópicos que son beneficiadas por la oferta de recursos, como los coatíes (*Nasua narica*) en Quintana Roo. El incremento en la abundancia de reservorios potenciales de enfermedades transmitidas por vector, como los coatíes, el incremento en las interacciones humanos-fauna silvestre y la presencia y abundancia de mosquitos, promueven el riesgo de transmisión bidireccional de arbovirus en los coatíes y los visitantes susceptibles. Diversas enfermedades Infecciosas emergentes (EIE) son causadas por arbovirus; virus que requieren de un artrópodo hematófago para completar su ciclo de transmisión. Los arbovirus de mayor relevancia médica pertenecen a las familias: *Flaviviridae*, *Togaviridae* y *Bunyaviridae*. El objetivo general del trabajo fue realizar la identificación molecular de arbovirus de éstas tres familias en poblaciones de coatíes (*Nasua narica*) silvestres y mosquitos hematófagos para estimar la fuerza de asociación (riesgo relativo) de algunos factores de riesgo antrópicos asociados a la presencia de arbovirus. La detección molecular de arbovirus se realizó por la técnica de Transcripción Reversa y Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT-PCR). Se analizaron 1,609 especímenes hembras de mosquito y 160 muestras de suero sanguíneo de coatíes. Ningún mosquito analizado resultó positivo; seis muestras de coatíes resultaron positivas a la familia *Bunyaviridae* (1.87%, n=3/160) y *Flaviviridae* (1.87%, n=3/160). Los análisis de secuenciación de las muestras corresponden a virus del Oeste del Nilo (VON) y virus del serogrupo Bunyamwera Cache Valley (CVV) y Cholul (CHLV). No se encontró asociación epidemiológica entre los factores de riesgo y la prevalencia de infección de coatíes reportados en los sitios de estudio. Éste es el primer reporte de evidencia de ARN viral de VON, CVV y CHLV en coatíes silvestres, por ello es necesario dar continuidad a los estudios en esta especie para conocer su papel en la ecología de los arbovirus transmitidos por mosquitos hematófagos.

Palabras clave: *Bunyaviridae*, *Flaviviridae*, *Togaviridae*, vectores, aislamiento viral, virus del Oeste del Nilo, virus Cache Valley, virus Cholul.

2. Introducción

Las enfermedades infecciosas emergentes (EIE) están asociadas a cambios en la ecología de los hospederos, el patógeno, sus vectores o por modificaciones ambientales por causas antrópicas y naturales (Daszak et al. 2000). Las EIE presentan incremento en su incidencia o han ampliado su rango geográfico, moviéndose a nuevas poblaciones de hospederos (Daszak et al. 2001).

Durante los últimos 20 años, se ha reportado un dramático incremento de enfermedades virales, con más de 100 nuevos virus reconocidos. El 30% de las EIE son causadas por arbovirus (Jones et al. 2008), virus que requieren de un artrópodo hematófago para completar su ciclo de vida (Gubler 2002). Los arbovirus de importancia médica transmitidos por mosquitos hematófagos, pertenecen principalmente a las familias: *Flaviviridae*, *Togaviridae* y *Bunyaviridae*, aunque existen otras familias de arbovirus de relevancia para la salud pública y veterinaria (Gubler y LeDuc 1998).

Los principales arbovirus detectados han sido el virus Dengue, encefalitis Japonesa, fiebre amarilla y encefalitis equina Venezolana, de igual interés son aquellos virus que han expandido su distribución geográfica tales como el virus del Oeste del Nilo y fiebre del Valle de Rift (Gubler 2002), virus Chikungunya (Weaver y Forrester 2015) y virus Zika (Weaver y Reisen 2010).

La expansión mundial de vectores invasores son los responsables de transmitir gran parte de las arbovirosis emergentes (Mackenzie et al. 2004). Los vectores de mayor importancia son los mosquitos (Weaver y Reisen 2010) y son la causa indirecta de más morbilidad y mortalidad entre los seres humanos que cualquier otro grupo de organismos (Kuno y Chang 2005).

La mayoría de los arbovirus causan zoonosis y dependen de diferentes especies animales para mantenerse circulando. Muchas especies son hospederos reservorios y otros hospederos accidentales (Gubler 2002). Varias especies de carnívoros silvestre son hospederos claves para identificar patógenos emergentes (Aguirre 2009). Los coatíes (*Nasua narica*), son mamíferos de talla mediana (Carnívora: Procyonidae), son una especie altamente sinantrópica y con

poblaciones abundantes en áreas perturbadas (Ceballos y Oliva 2005). A pesar de su estrecha interacción con el humano, los estudios de monitoreo epidemiológico realizados en esta especie son escasos, y se han enfocado principalmente en el diagnóstico del virus del Oeste del Nilo (Farfán-Ale et al. 2006), Dengue, fiebre amarilla y encefalitis de San Luis (De Thoisy et al. 2004).

Cove et al (2014) mencionan que la alteración del paisaje, la pérdida de carnívoros depredadores de mamíferos medianos, el cambio de uso de suelo por alteraciones humanas y la alta disponibilidad de alimentos como en el caso de polos de desarrollo turístico puede permitir un incremento en las poblaciones de meso depredadores como cabeza de viejo (*Eira barbara*), coatí (*Nasua narica*) y mapache (*Procyon lotor*).

Antecedentes

El término arbovirus es un acrónimo que proviene del inglés “arthropod borne virus” (virus transmitidos por artrópodos). Los arbovirus son virus heterogéneos de forma esférica o de bastón, su tamaño varía entre 17 – 150 nm y tienen genoma ARN (Weaver y Reisen 2010).

Se han registrado 534 virus en el catálogo internacional de arbovirus (Karabatsos 1985), de los cuales solo 214 están clasificados, 134 causan enfermedades al hombre y 50 afectan animales domésticos y silvestres (Hubálek et al. 2014). Los arbovirus son taxonómicamente diversos y pertenecen a ocho familias virales y 14 géneros. Las familias (subfamilias y géneros) de arbovirus transmitidas por vectores se presentan en el siguiente cuadro:

Cuadro 1. Taxonomía de los arbovirus hasta nivel de género (Hubálek et al. 2014; ICTV 2015).

Familia	Subfamilia	Géneros
<i>Asfaviridae</i>		<i>Asfavirus</i> .
<i>Bunyaviridae</i>		<i>Nairovirus, Orthobunyavirus, Phlebovirus y Tospovirus</i> .
<i>Flaviviridae</i>		<i>Flavivirus</i> .
<i>Rhabdoviridae</i>		<i>Vesiculovirus</i> .
<i>Reoviridae</i>	<i>Sedoreovirinae</i>	<i>Orbivirus, Phytoreovirus y Seadornavirus</i>
	<i>Spinareovirinae</i>	<i>Coltivirus y Dinovernavirus</i> .
<i>Orthomyxoviridae</i>		<i>Quaranjavirus y Thogotovirus</i>
<i>Togavirus</i>		<i>Alphavirus</i>

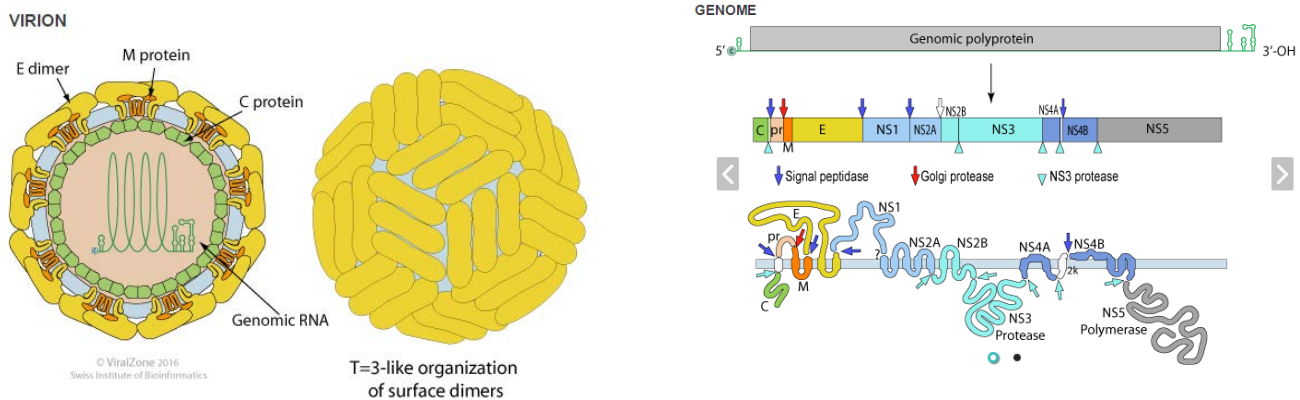
Los arbovirus de importancia médica transmitidos por mosquitos hematófagos, pertenecen a las familias: *Flaviviridae* (género *Flavivirus*), *Bunyaviridae* (género *Orthobunyavirus*) y *Togaviridae* (género *Alphavirus*), están presentes en todos los continentes y en México se han reportado nueve de las 20 principales enfermedades causadas por arbovirus (Gubler 2002; cuadro 2).

Los arbovirus del género *Flavivirus* están conformados por 53 especies y presentan un virión de aproximadamente 50 nm de diámetro, son esféricos, con una envuelta lipídica procedente de la membrana plasmática de la célula a la que infectan y que ha sido modificada por la inserción de dos glicoproteínas integrales de membrana, la proteína de la envuelta (E) y la proteína de la pre-membrana/membrana (prM); dentro de ella tienen una nucleocápside icosaédrica que contiene una única hebra de ARN de polaridad positiva de aproximadamente 11 kb que representa un único ARNm en las células infectadas (ICTV 2017a).

Posee tres proteínas estructurales (de la cápside, PrM y E) codificadas en el extremo 5' y siete no estructurales (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5) codificadas en el extremo 3'. Las proteínas estructurales interactúan con el ARN genómico viral y la membrana lipídica derivada del hospedador para formar la partícula viral. La proteína estructural E está involucrada en la unión a los receptores, la fusión de las membranas celulares y el ensamblaje de los viriones. Interviene en la inducción de la respuesta inmune protectora, pues es el antígeno encargado de generar anticuerpos neutralizantes. También, afecta el rango de

hospedadores, tropismo hacia los diferentes tejidos y virulencia (Roehring et al. 2003) (Figura 1).

Figura 1. Virión y estructura del genoma de los virus del género *Flavivirus*, familia *Flaviviridae* (Viralzone 2017).



La mayoría de las proteínas no estructurales son multifuncionales y todas ellas están implicadas directa o indirectamente en la síntesis de ARN viral, estas proteínas regulan la transcripción y replicación de la célula hospedadora para modular la respuesta frente a la infección (Beasley 2005).

La infección comienza con la entrada del virus a la célula a través de una endocitosis mediada por receptores celulares específicos para la proteína E, liberándose la nucleocápside viral al citoplasma y el ARN viral es leído como único mensajero y traducido como una poliproteína única. La replicación se lleva cabo en el citoplasma, en la superficie del retículo endoplásmico (RE); el virus elabora una copia complementaria del genoma en sentido negativo que sirve como un filamento de molde para la replicación y formación de ARN en sentido positivo. El ensamblaje del virión se inicia en el lumen del RE cuando el genoma de ARN positivo se asocia con la proteína C para formar la nucleocápside y adquiere la envoltura de las membranas del RE del hospedador. Los viriones son transportados a la membrana plasmática en vesículas y liberados de la célula hospedadora por exocitosis (Roehring et al. 2003).

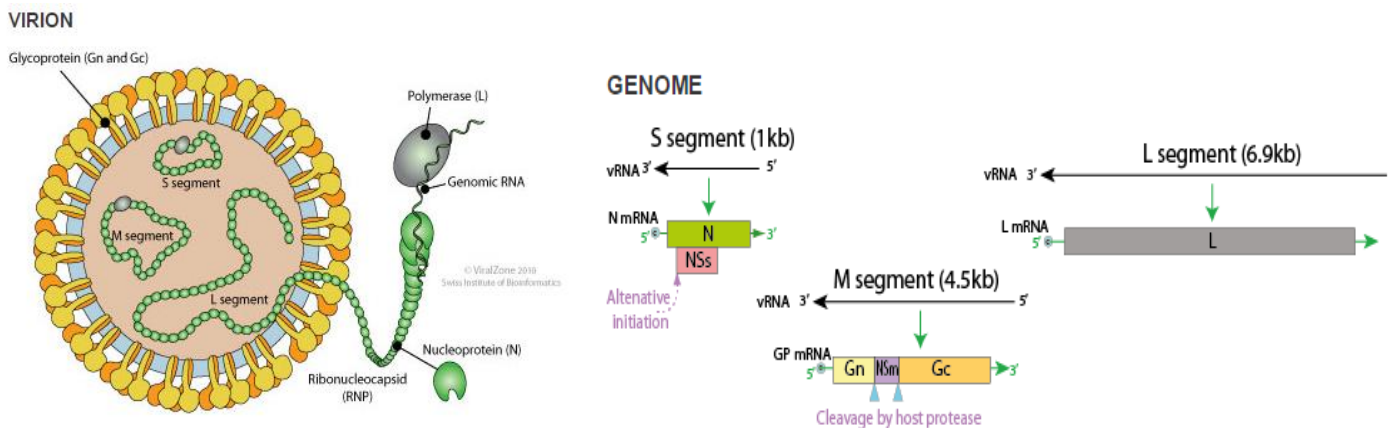
Los arbovirus del género *Orthobunyavirus* comprende 170 virus incluyendo al virus prototipo (virus Bunyamwera) dividido en 18 serogrupos (Anopheles A, Anopheles B, Bakau, Bunyamwera, Bwamba, Grupo C, Capim, California,

Gamboa, Guama, Koongol, Minatitlan, Nyando, Olifanstlei, Patois, Simbu, Tete y Turlock). Cada grupo contiene virus o tipos relacionados pero antigénicamente distintos (Elliott et al. 1991).

Poseen viriones esféricos de 90-100 nm de diámetro. La envuelta está compuesta por una bicapa lipídica que contiene espículas glicoproteicas que rodea al núcleo consistente en el genoma asociado a proteínas. Poseen dos glicoproteínas designadas como G1 y G2, salvo en algunas especies de Nairovirus que tienen tres. La envuelta no procede de la membrana plasmática de las células infectadas sino de vesículas intracitoplasmáticas asociadas al aparato de Golgi. La liberación de los viriones se produce bien por muerte y ruptura de la célula infectada o por transporte a la superficie celular de las vesículas conteniendo viriones ensamblados (Schmaljohn y Hooper 2001).

El genoma es ARN de cadena sencilla y polaridad negativa segmentado en tres partes: Segmento largo (L), mediano (M) y corto (S): El Segmento L codifica la polimerasa dependiente de ARN, necesaria para la replicación viral y síntesis de ARNm. El segmento M codifica las glicoproteínas virales (G1 y G2), las cuales protegen la superficie del virus y le asisten en la unión con la célula hospedadora. El segmento S codifica la proteína del nucleocápside (N) y la proteína no estructural (Schmaljohn y Hooper, 2001) (Figura 2).

Figura 2. Virión y estructura del genoma de los virus del género *Orthobunyavirus*, familia *Bunyaviridae* (Viralzone 2017).

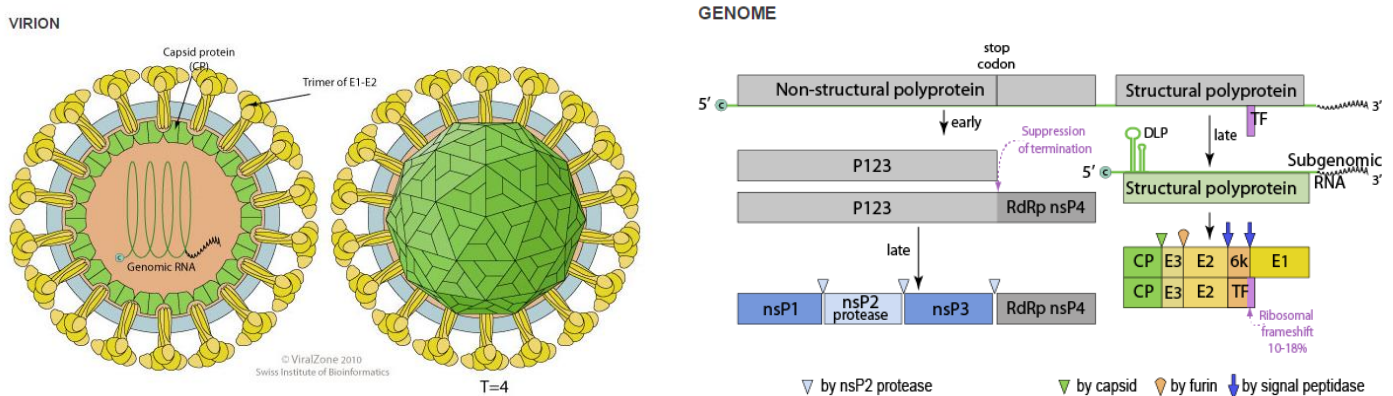


Los arbovirus del género *Alphavirus* comprenden 29 especies divididas en virus del Viejo y el Nuevo Mundo, arbovirus de mayor importancia para los primeros son: virus Ross River, Chikungunya y o'nyong-nyong; para los segundos son: virus de encefalitis equina Venezolana, del Este y del Oeste respectivamente (Weaver 2006).

El virión está encapsulado y forma partículas esféricas de 65 a 70 nm de diámetro. La envuelta contiene proyecciones de glicoproteínas de la envoltura (E1 y E2) con especificidades para el grupo y tipo del virus. El genoma es ARN de cadena simple y de polaridad positiva de 10-12 Kb de largo. El genoma codifica cuatro proteínas no estructurales en la cápside y el extremo 5' y dos proteínas de la envoltura en el extremo 3' (Kuno y Chang 2005).

Las proteínas no estructurales (nsP1 a nsP4), son proteínas para la transcripción y réplica del RNA viral. Las proteínas estructurales son la Proteína C, E1, E2 y E3. La Proteína C forma la cápside del virus, y las proteínas E1 y E2 forman glicoproteínas, parte de las espículas de superficie (Kuno y Chang 2005) (Figura 3).

Figura 3. Virión y estructura del genoma de los virus del género *Alphavirus*, familia *Togaviridae* (Viralzone 2017).



Cuadro 2. Principales géneros de arbovirus transmitidos por mosquitos hematófagos, distribución mundial y registro en México.

Género	Virus	Vector	Hospedero	Ecología	Dist. Mundial	México	
<i>Orthobunya-virus</i>	encefalitis La Cross	<i>Aedes</i> sp.	Conway et al. 2014	Roedores	R, S	América del Norte	Sin reporte
	fiebre del Valle de Rift	<i>Aedes</i> sp.	Weaver y Reisen 2010	Roedores	R	África, Medio Oeste	Sin reporte
<i>Phlebovirus</i>	encefalitis California	<i>Aedes</i> sp.	Weaver y Reisen 2010	Roedores	R	Norteamérica, Europa, Asia.	Sin reporte
	Chikungunya	<i>Aedes</i> sp.	Conway et al. 2014	Humanos, Primates	U, S, R.	África, Asia y América	Cigarroa-Toledo et al. 2016
<i>Alphavirus</i>	Ross River	<i>Aedes</i> sp.	Weaver y Reisen 2010	Humanos, Marsupiales	U, S, R.	Australia, Pacífico Sur, Sudamérica	Sin reporte
	Mayaro	<i>Haemagogus</i> sp., <i>Aedes</i> sp.	Muñoz y Navarro 2012	Aves	R	Sudamérica	Navarrete-Espinosa 2006
	O'nyong-nyong	<i>Anopheles</i> spp.	Conway et al. 2014	¿?	R	África	Sin reporte
	Sindbis	<i>Aedes</i> sp.	Conway et al. 2014	Aves	R	Asia, África, Australia, América	Sin reporte
	Barmah forest			¿?	R	Australia	Sin reporte
	e. e. del Oeste	<i>Aedes</i> sp., <i>Culex</i> sp.	Moore et al. 1993	Aves	R	América	Ssa 2001
	e. e. del Este	<i>Aedes</i> sp., <i>Culex</i> sp.	Moore et al. 1993	Aves, Conejos	R	América	Ssa 2001
	e. e. Venezolana	<i>Aedes</i> sp., <i>Culex</i> sp.	Moore et al. 1993	Roedores	R	América	Ssa 2001
	Dengue 1-4	<i>Aedes</i> sp.	Conway et al. 2014	Humanos, Primates	U, S, R.	Zonas tropicales	Loroño-Pino et al. 2004
	fiebre amarilla	<i>Aedes</i> sp.	Conway et al. 2014	Humanos, Primates	U, S, R.	África, Sudamérica	Sin reporte
<i>Flavivirus</i>	encefalitis Japonesa	<i>Culex</i> sp., <i>Aedes</i> sp., <i>Anopheles</i> sp.	Alan et al. 2004	Aves, cerdos	U, S, R.	Asia, Pacífico.	Sin reporte
	e. Valley Murray	<i>Culex</i> sp.	Conway et al. 2014	Aves	R	Sudamérica	Sin reporte
	Rocio	<i>Aedes</i> sp., <i>Culex</i> sp.	Moore et al. 1993	Aves	R	Sudamérica.	Sin reporte
	e. de San Luis	<i>Culex</i> sp.	Moore et al. 1993	Aves	U, S, R.	África, Asia, Europa, América	Ssa 2001
	virus del Oeste del Nilo	<i>Culex</i> sp.	Conway et al. 2014	Aves	U, S, R.	África, Asia, Europa, América.	Estrada-Franco et al. 2003
Zika	<i>Aedes</i> sp.	Weaver y Reisen 2010	Humanos, Primates	U, S, R.	África, Asia, América	Guerbois et al. 2016	

U= Urbano; S=Suburbano; R= Rural.

Mosquitos hematófagos

Los arbovirus son transmitidos por artrópodos hematófagos como dípteros nematóceros: chinches chupadoras (familia Ceratopogonidae), mosquitos (familia Culicidae), y flebotomos (familia Psychodidae, Subfamilia Phlebotominae); dípteros hemípteros: chinches de cama (familia Cimicidae) y arácnidos como las garrapatas duras y blandas (familias Ixodidae y Argasidae) (Hubálek et al. 2014).

Los mosquitos pertenecen a la familia *Culicidae* que incluye a 3,546 especies clasificadas en dos subfamilias y 112 géneros. La subfamilia *Anophelinae* tiene tres géneros y *Culicinae* tiene 109 géneros segregados en 11 tribus (MTI 2015). Los mosquitos de importancia médica para Norteamérica (Canadá, EE.UU, México y Puerto Rico) están constituidos por los géneros *Aedes* (cinco subgéneros y 18 especies), *Anopheles* (tres subgéneros y 9 especies), *Culex* (dos subgéneros y 9 especies), *Coquilettidia*, *Culiseta*, *Haemagogus*, *Mansonia*, *Psorophora* y *Sabethes*, estos últimos representados por una especie (WRBU 2015). En México, la familia *Culicidae* está representada por 18 géneros y 247 especies, que representa el 7.2% de la fauna mundial de mosquitos (Darsie y Ward 2005).

Las especies de mosquitos de mayor importancia médica en la transmisión de arbovirus son *Aedes spp.* y *Culex spp.* (Conway et al. 2014).

Los mosquitos en estados juveniles (larvas y pupas) permanecen en cuerpos de agua con poca movilidad; las larvas de los mosquitos emergen de los huevos y se alimentan de microorganismos; en tanto que los mosquitos que emergen de la pupa se alimentan de néctar. Las hembras adultas que van a reproducirse se alimentan de sangre. El ciclo continúa con los mosquitos ovopositando en el agua (Darsie y Ward 2005; MTI 2015).

Los mosquitos poseen diferentes mecanismos de selección para alimentarse de vertebrados, con particularidades a nivel de género (Conway et al. 2014). El huésped es seleccionado por factores extrínsecos como olor, calidad nutricional de la sangre (concentración de aminoácidos como isoleucina), color, calor corporal, masa corporal, comportamiento defensivo, la cual favorece la estrategia reproductiva de los mosquitos con altas tasas de fecundidad y supervivencia de los mosquitos (Kuno y Chang 2005; Takken y Verhulst 2013). Por otro lado, la humedad relativa y el clima influyen en la

selección de la presa. Cambios en la humedad relativa influyen en la dispersión de olor y sustancias químicas de la piel de las presas así como en la percepción del calor metabólico generado. Mientras que el clima (estaciones de verano e invierno) modifica los patrones de alimentación de aves a mamíferos y viceversa en especies de mosquitos *Culex spp.* (Takken y Verhulst 2013).

Las especies de mosquitos *Anopheles spp.*, *Aedes spp.*, *Mansonia spp.* y *Haemagogus spp.* tienen preferencia alimenticia hacia mamíferos (Kuno y Chang 2005). Aunque *Anopheles spp.* y *Aedes spp.* se caracterizan por ser antropofílicos (Conway et al. 2014); mientras que *Culex spp.* y *Culiceta spp.* tienen preferencia ornitofílica (Turell et al. 2001; Hamer et al. 2009), también pueden alimentarse de reptiles, anfibios y mamíferos (Kuno y Chang 2005).

La vía más común de transmisión biológica de arbovirus es la transmisión horizontal y se da cuando un mosquito hematófago se alimenta de sangre virémica, el virus se replica en el mosquito e inocular saliva a un hospedero vertebrado (Musso y Gubler 2016). Puede suceder la transmisión vertical entre vectores (Weaver y Reisen 2010). También, se ha reportado la transmisión de arbovirus en ausencia de un vector y se da directamente entre humanos (de madre a hijo, por transfusión, trasplantes de órganos y por vía sexual (Musso y Gubler 2016).

La competencia vectorial para un arbovirus se ve afectada por factores y mecanismos intrínsecos (genéticos) que controlan la capacidad de un mosquito vector para adquirir, mantener y transmitir un arbovirus (Conway et al. 2014). Los factores genéticos de la competencia vectorial están relacionados con la inmunidad innata del mosquito y son barreras tisulares que el arbovirus necesita superar: barrera de infección del intestino medio, barrera de escape del intestino medio, barrera de infección de glándulas salivales y barrera de escape de glándulas salivales. Los factores genéticos pueden variar ampliamente entre las especies de mosquitos y los arbovirus implicados, de tal modo que los arbovirus están adaptados para superar con éxito los factores genéticos relacionados con la capacidad vectorial (Franz et al. 2015).

Para que la infección de mosquitos por arbovirus sea exitosa, debe existir la infección y propagación en el intestino medio, difusión y amplificación secundaria del arbovirus del intestino medio hacia tejidos secundarios, posterior infección de las

glándulas salivales (a veces tejidos reproductivos para la transmisión vertical a la descendencia) y liberación del virus en los conductos salivales para su transmisión horizontal a hospederos vertebrados (Franz et al. 2015).

La temperatura ambiental máxima y mínima diaria, afectan la tasa de multiplicación del patógeno dentro del vector (periodo de incubación extrínseca), que a su vez afecta la tasa de infección de las glándulas salivales y por lo tanto la probabilidad de transmisión de arbovirus a un hospedero (Gubler et al. 2001). Si el periodo de incubación extrínseca excede el tiempo de vida del vector, la transmisión no ocurrirá, por lo tanto la longevidad del vector es muy importante y ésta puede ser acortada cuando ocurren temperaturas ambientales elevadas (Gubler et al. 2001).

Hospederos y ciclos de transmisión de arbovirus

La gama de hospederos vertebrados para un arbovirus está determinada por rasgos genéticos. De tal modo que, sin importar que se cumplan los requisitos necesarios para establecer la transmisión biológica, muchos virus no se replican lo suficiente en ciertos hospederos debido a estas restricciones genéticas (Kuno y Chang 2005). Por otro lado, la relación vector-hospedero está influenciada por múltiples factores abióticos y biológicos; dentro de los más importantes son las barreras geográficas y la ausencia de sincronismo estacional entre la disponibilidad de hospederos infectados en etapa virémica y la actividad alimentaria de los vectores (Kuno y Chang 2005).

Los hospederos se clasifican en amplificadores o primarios, reservorios o secundarios y finales o incidentales (Day y Shaman 2003). Los hospederos amplificadores se caracterizan por ser susceptibles a la infección viral y producir viremias de alto nivel (10,000 viriones / ml de sangre) para poder infectar al mosquito; necesitan ser abundantes y tener una amplia distribución espacial para asegurar el contacto con los vectores (Day y Shaman 2003). En ellos, el virus circula en sangre por un tiempo relativamente corto (días), debido a que el sistema inmunológico le provee inmunidad durante toda la vida (Day y Shaman 2003).

Los hospederos reservorios, a diferencia de los amplificadores, presentan viremias prolongadas y permiten la supervivencia del virus en el hospedero (Day y

Shaman 2003). Los hospederos finales, se caracterizan por no alcanzar una viremia suficiente para infectar mosquitos y por lo tanto no son eficientes la para supervivencia y propagación de arbovirus (Day y Shaman 2003).

Muchas especies de animales son huéspedes secundarios de arbovirus (Musso y Gubler 2016). En algunos arbovirus del género *Flavivirus* como el VON y la encefalitis Japonesa, las aves paserinas son sus hospederos amplificadores (Weaver 2006); en tanto que para el virus Dengue, Chikungunya y fiebre amarilla, los hospederos primarios son los primates humanos (Musso y Gubler 2016) y no humanos (Weaver 2006). En los virus del género *Orthobunyavirus* los hospederos primarios son los ungulados silvestres y domésticos; los hospederos incidentales son los humanos (Horne y Vanlandingham 2014). Para el género *Alphavirus*, las aves y los pequeños mamíferos son hospederos amplificadores y reservorios, los humanos y los animales domésticos son hospederos incidentales (Weaver 2006).

La mayoría de los arbovirus se propagan por tres ciclos de transmisión: selvática o enzoótica, rural o epizoótica y urbana (Weaver y Reisen 2010). El ciclo de transmisión selvática se da entre mosquitos y hospederos enzoóticos (roedores, aves, primates no humanos y otros vertebrados). En este ciclo, puede ocurrir la transmisión a hospederos finales (humanos o animales domésticos) que no juegan un papel importante en el mantenimiento del arbovirus (Hollidge et al. 2010). Algunos arbovirus como la encefalitis equina Venezolana y la encefalitis Japonesa han ampliado su rango de transmisión, estableciendo ciclos de amplificación epizoótica en caballos y cerdos, descrito como ciclo de transmisión epizoótico o rural (Weaver 2006). En el ciclo urbano, los humanos se han convertido en el principal huésped amplificador para el virus Dengue, fiebre amarilla, Chikungunya principalmente (Weaver y Reisen 2010).

También se han descrito dos patrones de transmisión dependientes del clima. Uno en zonas tropicales, donde los arbovirus circulan durante la mayor parte del año con un pico estacional amplio y otro en climas templados, donde el virus se transmite entre los vectores y hospederos durante los meses más cálidos y las enfermedades por arbovirus están ausentes en los meses fríos (Hollidge et al. 2010).

Factores ambientales y antropogénicos asociados a la emergencia y reemergencia de arbovirus

Las alteraciones climáticas son el factor que más ha influido en la emergencia de arbovirus (Githeko et al. 2000). La intensificación de desastres naturales como huracanes o inundaciones (Gubler et al. 2001), modificaciones al ecosistema (creación de represas, campos de cultivo de arroz, entre otros) incrementan la proliferación de vectores (Mackenzie et al 2004) y con ellos la incidencia de arbovirus en vectores y hospederos (Gluber et al. 2001).

Por otra parte, las modificaciones al ecosistema y los cambios de uso de suelo (deforestación, centros urbanos, campos de cultivo) favorecen la interacción vectores-hospederos y amplían la gama de vectores y hospederos, haciendo más complejo el ciclo de transmisión de arbovirus (Weaver 2006).

La reciente reemergencia de alguno arbovirus como el virus de la encefalitis Japonesa y VON se debe a los cambios de uso de suelo y al cambio de patrones migratorios de aves a causa de las alteraciones climáticas (Gluber et al. 2001). En el caso del virus Dengue y Chikungunya por el transporte internacional de personas (pacientes virémicos) (Mackenzie et al. 2004) o por el establecimiento de zonas periurbanas donde hay carencias en el manejo de agua potable y alcantarillado y no existe un adecuado control de vectores (Githeko et al. 2000).

Otro factor, es que los mosquitos han ampliado su rango de distribución geográfica, como *Ae. albopictus* en América y *Cx. gelidus* en Asia, al ser transportados de manera incidental por vía aérea o marítima (Mackenzie et al. 2004; Weaver 2006).

Enfermedades emergentes asociadas a arbovirus en México

De acuerdo con la Secretaría de Salud (2001), México se mantiene en vigilancia epidemiológica por el riesgo de introducción de fiebre amarilla desde América del Sur. Por otro lado, La Organización Mundial de Salud Animal (OIE 2005) enlista al virus de la encefalitis Japonesa, al virus de la fiebre del Valle de Rift y al virus de la encefalitis equina Venezolana como enfermedades exóticas en México y de declaración obligatoria.

Respecto a los arbovirus del género *Alphavirus* (familia *Togaviridae*), Aguirre et al. (1992) reportaron evidencia serológica por Neutralización por Reducción del Número

de Placas (NRNP) del virus de la encefalitis equina Venezolana, encefalitis equina del Este y encefalitis de San Luis en mamíferos y aves silvestres en el noreste de México. Por otro lado, el virus de la encefalitis equina Venezolana se ha aislado de humanos, equinos y animales silvestres en las costas de Chiapas, Istmo de Tehuantepec y sur de Veracruz (SSA 2001).

Navarrete-Espinosa y Gómez-Dantés (2006) reportaron dos casos positivos de encefalitis por virus Mayaro con prueba de ELISA IgM en pacientes humanos en los estados de Veracruz y Tamaulipas. Hasta la fecha no se tienen reportes en animales domésticos o silvestres.

El primer caso de Chikungunya se presentó en 2014 (Rivera-Ávila 2014). En octubre de 2014, el virus se reportó y aisló en Ciudad Hidalgo, Chiapas (Kautz et al. 2015). En este mismo periodo, Díaz-Quiñonez et al. (2015) realizaron el aislamiento viral de virus Chikungunya en mosquitos *Ae. aegypti* provenientes de Jalisco y Chiapas. En 2015, el virus Chikungunya fue aislado en mosquitos *Ae. aegypti* y en humanos en la Península de Yucatán (Cigarroa-Toledo et al. 2016). Desde entonces y hasta enero de 2017, se han reportado 12,354 casos confirmados en humanos (OPS, 2014, 2015, 2016, 2017).

Respecto a los arbovirus del género *Flavivirus* (familia *Flaviviridae*), En México se presentó una epidemia del virus de la encefalitis de San Luis, con 51 casos humanos en la ciudad de Hermosillo, Sonora, 12 de ellos confirmados por serología (González-Cortés et al. 1977, citados por García 2007). En 2001 se realizó un estudio serológico en animales domésticos en Chiapas, en el que 20 de 202 mostraron anticuerpos para este virus (Ulloa et al. 2003).

El virus Dengue se ha reportado en varios estados de la República Mexicana (SSA 2001). La primera evidencia de virus Dengue en vertebrados no primates, se reportó en cuatro especies de quirópteros en los estados de Colima, Jalisco y Veracruz (Aguilar-Setién et al. 2008). Sobre la misma línea, Sotomayor-Bonilla et al. (2014) reportan en Campeche y Chiapas, evidencias de ARN viral sin secuenciación de DENV-2 en tres especies de quirópteros.

Los primeros reportes de seroprevalencia del virus del Oeste del Nilo se presentan en el año 2002 por la Secretaría de Ganadería, Agricultura, Desarrollo Rural,

Pesca y Alimentación (SAGARPA) encontrando seis estados seropositivos (Chihuahua, Coahuila, Tamaulipas, Veracruz, Tabasco y Yucatán; Estrada-Franco et al. 2003). Los casos reportados por seroprevalencias o aislamiento viral ha sido en humanos, caballos y especies silvestres (Estrada-Franco et al. 2003; Loroño -Pino et al. 2003; Machain-Williams et al. 2013; Morales-Betoulle et al. 2013; OPS 2015).

El primero reporte de virus Zika en México ocurrió en Chiapas en 2015, por detección de ARN viral en pacientes febriles y muestras de mosquitos *Ae. Aegypti* (Guerbois et al. 2015). Hasta enero de 2017, se han reportado 7,599 casos confirmados (OPS 2017).

Referente a los arbovirus del género *Orthobunyavirus* (familia *Bunyaviridae*), en la Península de Yucatán se reportó una seroprevalencia por NRNP de virus Cache Valley del 18% en pacientes febriles (Blitvich et al. 2012a). Blitvich et al. (2012b) reportaron evidencia serológica por NRNP de los virus Cache Valley (9.7% - 26.4%), Cholul (19.3% - 33%), South river (19.9%) y otros *Orthobunyavirus* (33% - 51.6%) en animales domésticos de producción.

Enfermedades emergentes por arbovirus reportados en coatíes

Los reportes de arbovirus en coatíes son escasos y hacen referencia al virus Tucuri, perteneciente al serogrupo Anopheles A (género *Orthobunyavirus*, familia *Bunyaviridae*) (da Rosa et al. 1992), virus Ilheus, perteneciente a la familia *Flaviviridae* (Pereira et al. 2001) y virus Jatobal, perteneciente al grupo serológico Simbu, (género *Orthobunyavirus*, familia *Bunyaviridae*) Figueiredo y Rosa 1988, citado por Guimarães et al. (2012).

De Thoisy et al. (2004) realizaron un muestreo serológico a diferentes grupos de mamíferos (incluyendo a cuatro ejemplares de coatíes) en la Guyana Francesa para los virus Dengue, fiebre amarilla y encefalitis de San Luis. Por su parte, Farfán-Ale et al. (2006), en Yucatán, México, realizaron un monitoreo serológico por la técnica de ELISA por competencia para virus de Oeste del Nilo, en aves y mamíferos silvestres (incluyendo a cinco ejemplares de coatíes). Ambos estudios no reportaron evidencia serológica de infección.

Justificación

El incremento de las poblaciones silvestres de coatíes en las zonas de conservación de algunos desarrollos turísticos, ha favorecido una intensa interacción negativa entre coatíes y turistas que aumentan las tasas de contacto debido a problemas asociados a la sobreabundancia de esta especie. Existen reportes en la literatura que ubican a los coatíes como posibles hospederos de arbovirus. Aunado a esto, existe un creciente interés en conocer la prevalencia de arbovirus en poblaciones de animales silvestres y la posible dinámica o papel que juegan los mamíferos peridomésticos como los coatíes en la ecología de éstas enfermedades.

Por lo tanto, se hace necesario profundizar en el estudio de los arbovirus de las familias *Flaviviridae*, *Bunyaviridae* y *Togaviridae* para entender mejor la dinámica y la ecología de enfermedades asociadas a estos virus en ambientes perturbados.

Preguntas de Investigación e Hipótesis

Pregunta General: ¿Qué arbovirus están circulando en poblaciones de coatíes y mosquitos hematófagos y cuáles predominan en áreas ajardinadas con vegetación exótica y césped, fragmentos de manglar y acahuales de selva baja presentes en dos complejos turísticos ubicados en el estado de Quintana Roo?

Hipótesis 1: Si las poblaciones de coatíes en el estado de Quintana Roo están expuestas a arbovirus, entonces los vectores (mosquitos hematófagos) y las poblaciones de coatíes sujetas a estudio, presentarán evidencia molecular de arbovirus.

Hipótesis 2: Si la abundancia y composición de especies de mosquitos hematófagos es diferente entre los dos sitios de estudio, esta diferencia estará influenciada por la época del año (época de lluvias y secas), el grado de urbanización y la composición del uso de suelo (superficies de áreas verdes, cuerpos de agua y construcciones).

Hipótesis 3: Si los coatíes son picados por mosquitos hematófagos y la selección de sus presas concuerda con lo reportado en hábitats conservados, se espera que los

mosquitos de la tribu *Aedeomyiini* y *Mansoniini* (Subfamilia *Culicinae*) presenten mayor número de especímenes capturados por trampas Magoon en comparación a los mosquitos de la tribu *Culinici* (Subfamilia *Culicinae*).

Objetivo General

Identificar mediante técnicas moleculares arbovirus de importancia médica (familia *Bunyaviridae*, *Flaviviridae* y *Togaviridae*) en poblaciones silvestres de coatíes (*Nasua narica*) presentes en dos complejos turísticos, para inferir asociaciones epidemiológicas entre la diversidad local de mosquitos hematófagos, factores ambientales y antropogénicos, en uno de los más importantes destinos turísticos de México, la Riviera Maya, en el estado de Quintana Roo.

Objetivos Particulares

Objetivo 1: Determinar si los coatíes presentaron evidencia molecular de exposición a los arbovirus en época de lluvias y secas por detección de RT-PCR y secuenciación del ADN viral.

Objetivo 2: Determinar si los mosquitos hematófagos presentaron evidencia molecular de exposición a los arbovirus en época de lluvias y secas por detección de RT-PCR y secuenciación del ADN viral.

Objetivo 3: Estimar la diversidad y abundancia relativa de mosquitos hematófagos presentes en los sitios de estudio durante la temporada de lluvia y de secas.

Objetivo 4: Conocer las especies de mosquitos que presentan asociación hacia los coatíes (*Nasua narica*) en trampas Magoon.

Objetivo 5: Estimar las medidas de asociación epidemiológica (riesgo relativo) en poblaciones de mosquitos y coatíes en cada sitio de estudio.

3. Métodos

3.1. Sitios de estudio

El Estado de Quintana Roo está ubicado al sureste de la República Mexicana. (INEGI 2010). El clima predominante es cálido subhúmedo (99%) seguido del cálido húmedo (1%), la temperatura media anual es de 26°C con temperaturas máximas de 33°C (abril a agosto) y temperatura mínima promedio es de 17°C en enero (INEGI 2010). La precipitación media es de 1,300 mm anuales con las lluvias todo el año, siendo más abundantes de junio a octubre. La altitud va de 0 a 230 msnm (INEGI. 2010).

Como sitios de estudio, se seleccionó un complejo hotelero (sitio A) y un parque de atracciones turísticas (sitio B). A priori, se me solicitó guardar el anonimato de los sitios como requisito para llevar a cabo el estudio. El sitio A, está ubicado en el Municipio de Solidaridad, Quintana Roo y el sitio B, en el Municipio de Tulum, Quintana Roo (figura 4).

El sitio A posee una superficie aproximada de 78.55 ha, de las cuales, 47.17 ha (60 %) corresponden con áreas verdes (predominan jardines con vegetación exótica y césped, fragmentos de manglar y acahuales de selva baja), 0.07 ha (0.1 %) a cuerpos de agua y 31.31 ha (39.9 %) de construcciones (piscinas, estacionamientos, centros comerciales, restaurantes, habitaciones y áreas de operación). Ver figura 5.

El sitio B posee una superficie aproximada de 117 ha, de las cuales, 107.71 ha (92 %) corresponden a áreas verdes (predominan áreas de acahuales de selva baja), 0.53 ha (0.5 %) a cuerpos de agua y 8.76 ha (7.5 %) de construcciones (piscinas, estacionamientos, centros comerciales, restaurantes, y senderos de concreto y asfalto). Ver figura 6.

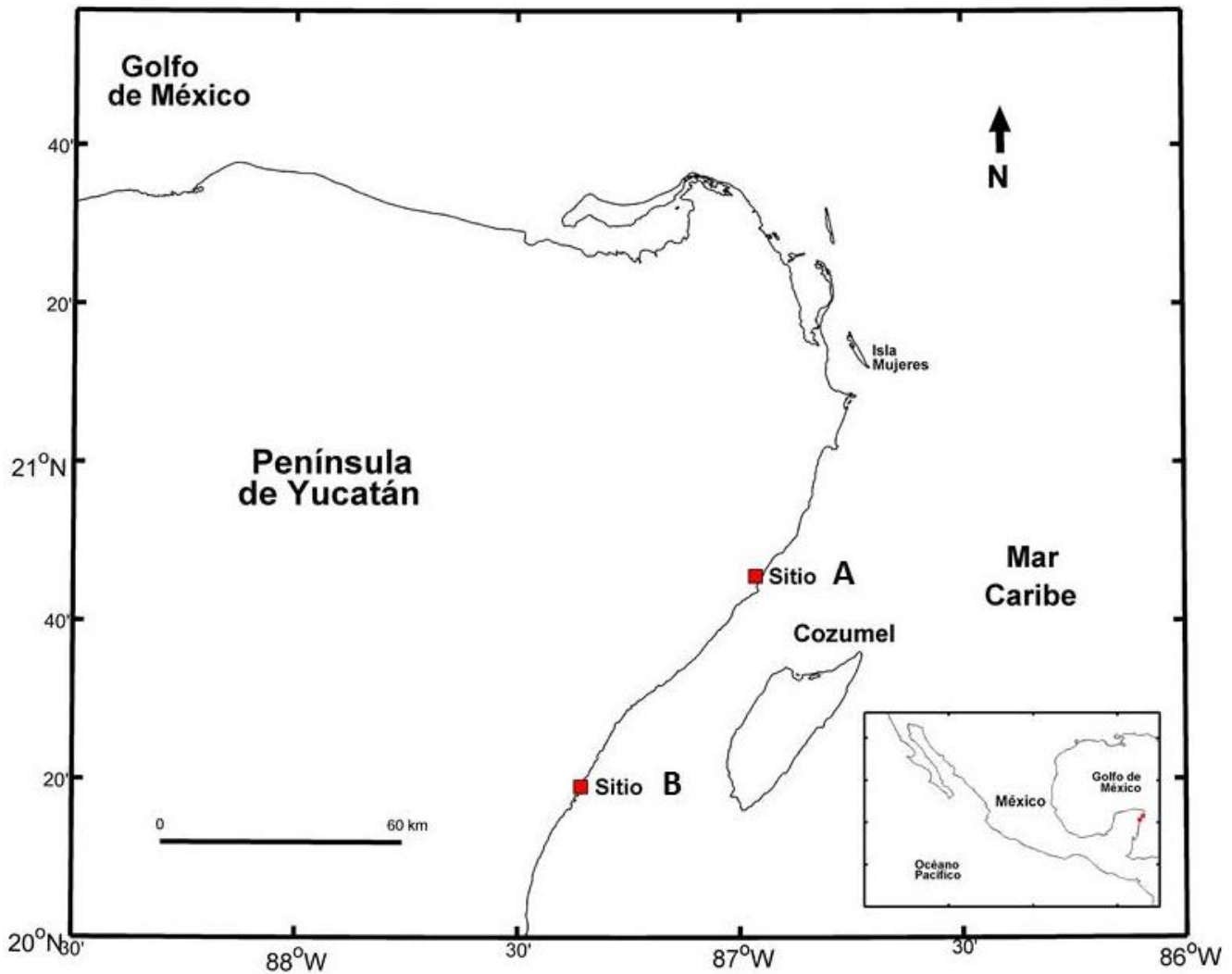


Figura 4. Ubicación geográfica de los sitios turísticos de estudio en el Estado de Quintana Roo.

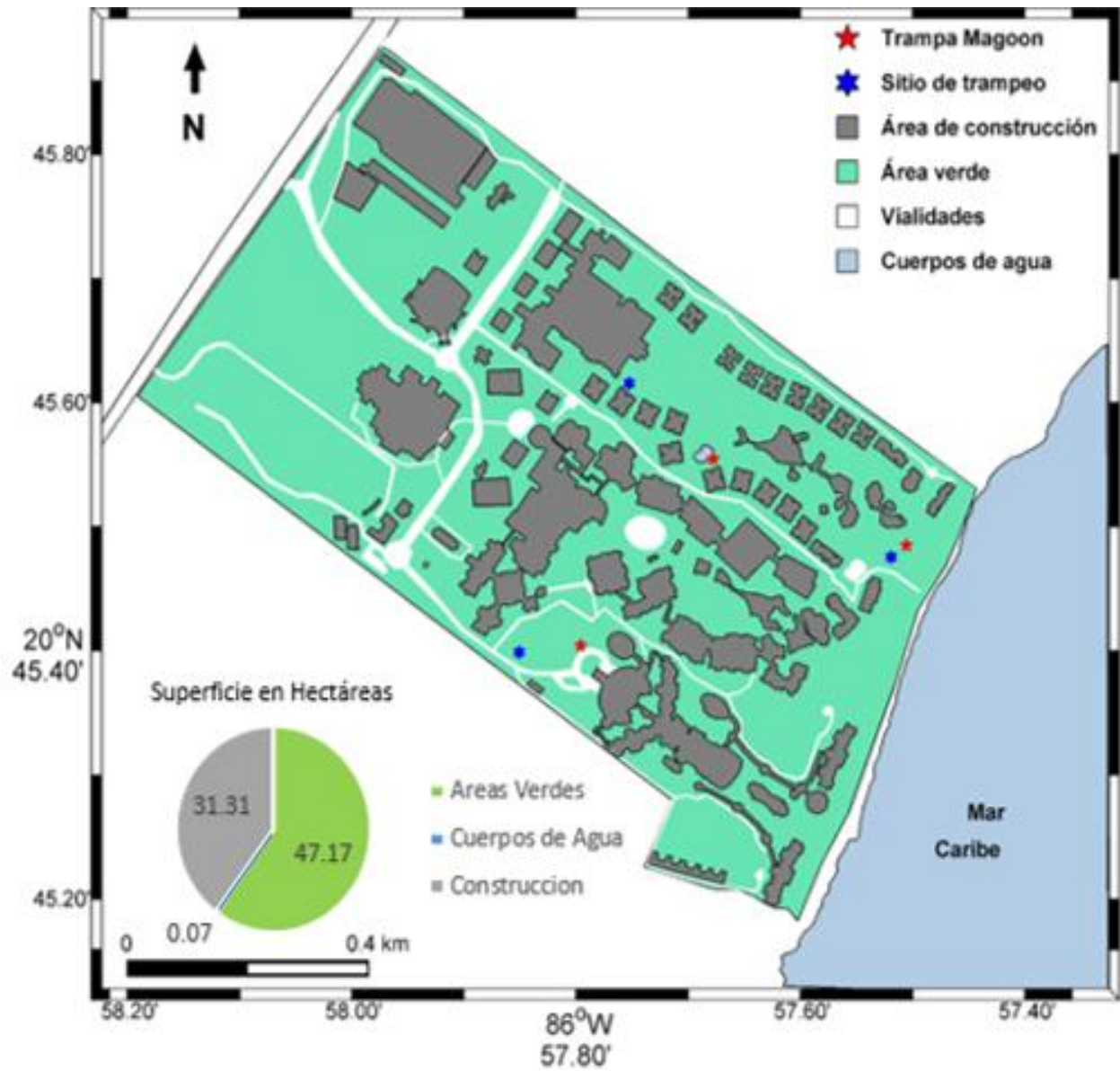


Figura 5. Mapa del Sitio A. Ubicación de trampas Magoon, sitios de captura de coatíes y superficie de áreas verdes, cuerpos de agua y construcciones.

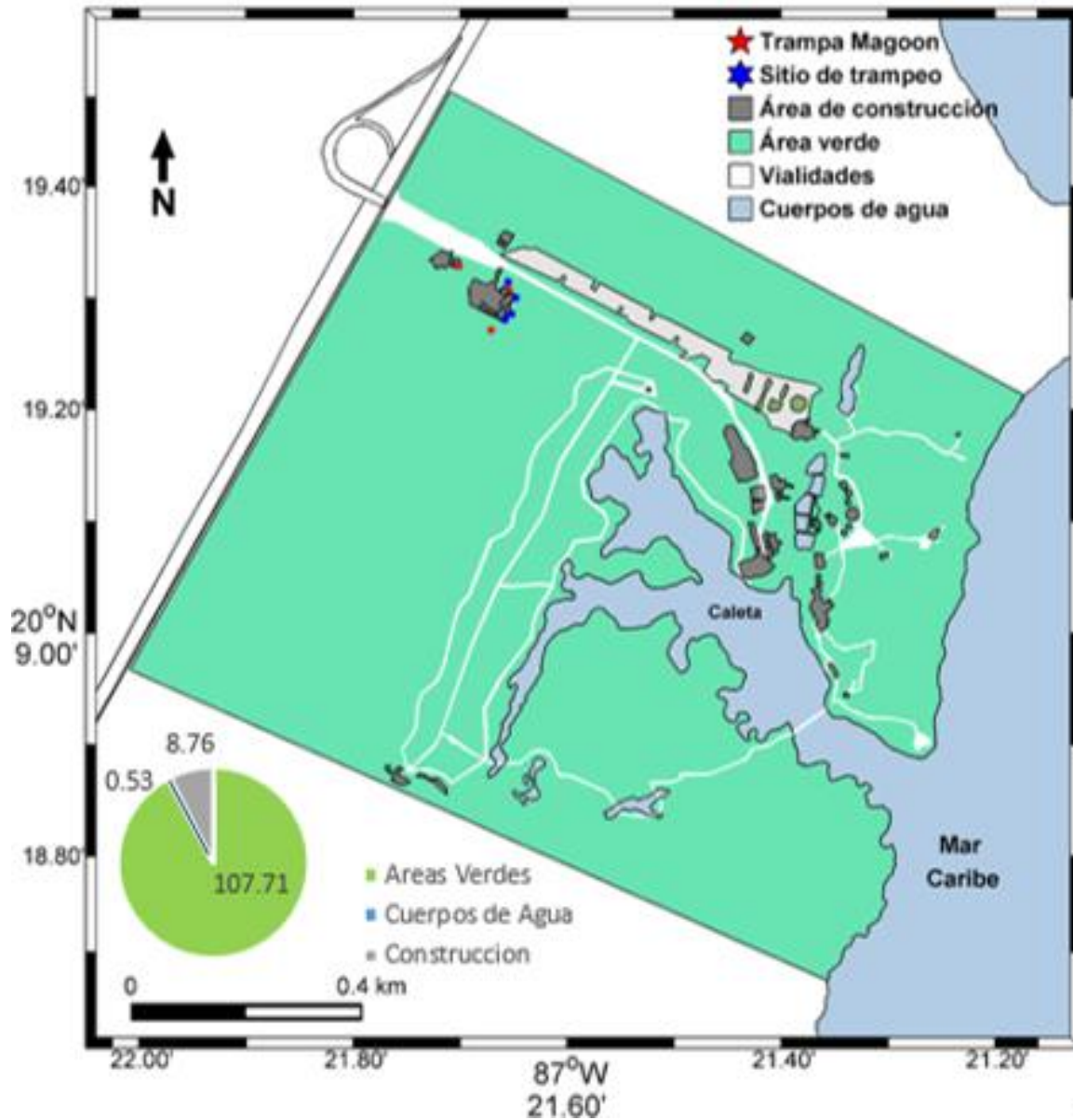


Figura 6. Mapa del Sitio B. Ubicación de trampas Magoon, sitios de captura de coatíes y superficie de áreas verdes, cuerpos de agua y construcciones.

3.2. Diseño de muestreo de mosquitos hematófagos

3.2.1. Colecta de mosquitos hematófagos

Los mosquitos hematófagos fueron colectados por dos métodos: Aspirados con mochilas entomológicas CDC Aspirator Back Pack (Bio Quip®, CA, EUA) y trampas Magoon con cebo vivo (García 2007), modificadas bajo las recomendaciones de M. Casas-Martínez (Morales, R 2015, Coms. Pers.), Las trampas se confeccionaron con tela de pabellón, color blanco (1.5 x 1.5 x 1.5 m) y se suspendieron a 0.3 m del suelo para permitir la entrada de mosquitos atraídos por el cebo vivo (figura 7).



Figura 7. Trampa Magoon Modificada para colectar mosquitos hematófagos, usando como cebo vivo a un ejemplar de coatí (*Nasua narica*).

Por sitio de estudio, se colocaron tres trampas Magoon en las zonas de permanencia de los coatíes y sitios con las características necesarias para la proliferación de mosquitos (zonas húmedas con vegetación y cuerpos de agua).

En cada trampa Magoon, se colocó un coatí silvestre adulto como atrayente, provisto de agua y comida *ad libitum*, contenido en una jaula tipo caja (Bautista et al. 2004), con dimensiones de 0.6 m de alto x 1.5 m de largo x 1.5 m de ancho; fabricadas con varilla corrugada de 3/8", malla para gallinero de 2 x 2 cm de luz y piso de triplay de 6 mm de grosor.

Esfuerzo de muestreo

Para el método de aspirado se obtuvo como horas-aspirado total (EMTA) y para el método de trampas Magoon fue como noches-trampa Magoon total (EMTT). Ver cuadro 3.

Cuadro 3. Fórmulas para obtener el esfuerzo de muestreo total por métodos de colecta de mosquitos hematófagos.

$EMTA = HA / ME / MPD / E / S$	$EMTT = NT / CPD / DM / E / S$
EMTA: Esfuerzo de muestreo total por aspirado	EMTT: Esfuerzo de muestreo total por trampa Magoon
HA: Horas de aspirado	NT: Número de trampas
ME: Mochilas entomológicas	CPD: Colectas por día
MPD: Muestreos por día	DM: Días de muestreo
DM: Días de muestreo	E: Época (Secas – Lluvia).
E: Época (Secas – Lluvia).	S: Sitio de estudio (A – B).
S: Sitio de estudio (A – B).	

Para ambos métodos, se realizaron colectas de mosquitos por tres días consecutivos en estación de secas (abril - mayo de 2016) y lluvias (julio - agosto de 2016) con dos colectas por día, uno por la mañana (7:00 a 10:00 horas) y otro al anochecer (19:00 a 22:00 horas).

Los mosquitos colectados por el método de aspirado, fueron capturados con ayuda de dos mochilas entomológicas, realizando aspirados exhaustivos en todos los sitios (edificios, caminos, coladeras, áreas verdes y cuerpos de agua naturales) donde se pudieran encontrar mosquitos. De igual forma, los mosquitos capturados en las trampas Magoon se colectaron con ayuda de una mochila entomológica.

Procesamiento, Identificación y conservación de mosquitos

Los mosquitos colectados, fueron almacenados en contenedores de plástico (rotulados por sitio de estudio, método, época, fecha y hora de colecta) e inmediatamente conservados en neveras con refrigerantes hasta su identificación, para evitar que el ARN viral se degradara (CDC 2013).

Durante la identificación, los mosquitos fueron mantenidos sobre bolsas refrigerantes para evitar que el ARN viral se degradara (CDC 2013). Los mosquitos fueron identificados por género y especie con ayuda de un microscopio estereoscópico y claves taxonómicas con base en las características morfológicas de cada especie capturada (Darsie y Ward 2005).

Una vez identificados, los machos fueron excluidos (pues al no ser hematófagos, no son vectores) y se conservaron a las hembras, las cuales fueron almacenadas por especie y contenidas en crio tubos de 2 ml (Corning®, NY, EUA) rotulados por sitio, época, fecha, hora de colecta y mantenidos en nitrógeno líquido (CDC 2013) hasta su análisis en el laboratorio.

3.2.2. Diseño de muestreo en coatíes

Captura y contención de coatíes

Los procedimientos realizados a los coatíes fueron aprobados por el comité de Ética para la Investigación de El Colegio de la Frontera Sur (CEI-O-006/16) y por la Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SGPA/DGVS/05526/16). Ver anexos 1 y 2.

Las capturas se realizaron en jaulas tipo caja (descritas anteriormente) provistas con una puerta tipo guillotina, activada por un observador en el momento que la mayor cantidad de individuos entraron a la jaula, procurando no lastimarlos al momento de activar la puerta. Tres jaulas por sitio fueron ubicadas en las áreas de vegetación cercanas a los centros de consumo de alimentos de los desarrollos turísticos; dichas jaulas fueron cebadas con frutas y croquetas para perro (marca Optimo, NUPEC), para atraer a los coatíes.

Toma, procesamiento y transporte de muestras sanguíneas de coatíes.

Los ejemplares se manipularon individualmente, con ayuda de un aro con red para contenerlo físicamente y los operarios portaron botas, guantes y mangas de carnaza como medida de protección especial (Denver 2003; AZA 2010), después fueron tranquilizados con Ketamina (100 mg) a dosis de 10 mg/Kg vía intramuscular (Denver 2003) y los signos vitales (temperatura corporal, frecuencia cardiaca,

frecuencia respiratoria y tiempo de llenado capilar) de cada ejemplar fueron monitoreados para asegurar su supervivencia y bienestar durante el manejo.

Se evaluó el estado de salud por medio de constantes fisiológicas y un examen clínico orientado a problemas. Por apreciación visual, en cada sitio de estudio se contabilizaron las frecuencias de lesiones externas (cambio anormal en la morfología o fisiología de los coatíes *e.g.* diarrea, heridas, tos, bajo peso, sobre peso, entre otros).

Se registraron datos morfométricos de medidas corporales, peso, sexo, clases de edad (cría, juvenil y adulto), constantes fisiológicas y datos del sitio de muestreo (Anexo 3). Las muestras sanguíneas fueron colectadas de la vena safena, cefálica, femoral o caudal (dependiendo del tamaño y estado físico del ejemplar) y conservadas en un tubo con anticoagulante (EDTA) con ayuda de sistemas de extracción sanguínea Vacutainer®, Beckton Dickinson, EUA) o jeringas estériles desechables de 3 ml (Plastipak, Becton Dickinson, EUA). Previo a la toma de las muestras sanguíneas, el sitio de punción fue desinfectado con algodón y cloruro de benzalconio. (Veloso y Silva 2001; Denver 2003; AZA 2010). Finalmente, los ejemplares fueron marcados con una muesca en el pabellón auricular (AZA 2010).

Las muestras sanguíneas fueron conservadas y almacenadas en viales (Eppendorf®, Alemania) de 1.5 ml en nitrógeno líquido (CDC 2013), hasta su envío al laboratorio.

Estimación de tamaño de muestra y poder estadístico para coatíes

En los años 2013 y 2014 se capturaron coatíes silvestres (éxito de captura promedio de 16.6 ± 3.65 coatíes día – trampa; $n=22$) de los sitios A y B. Estos datos se usaron como pre muestreo para estimar el tamaño de muestra y cálculo del poder estadístico (1-beta) con un nivel de confianza del 95%. Los datos fueron analizados con el software G*Power versión 3.1.9.2.

Como resultado, se requirió una muestra de 310 coatíes, 77 ejemplares por sitio y época. Además, se realizó un análisis de poder estadístico post-hoc para conocer el tamaño de muestra ideal requerido.

3.3. Análisis de Laboratorio

Las muestras fueron procesadas y analizadas en el laboratorio de Arbovirología del Centro de Investigaciones Regionales Dr. Hideyo Noguchi (Universidad Autónoma de Yucatán-UADY).

Homogenización de Mosquitos

Los mosquitos fueron procesados de manera individual, a cada uno se le agregó 300 µl de medio estéril Eagle (Minimum Essential Medium, MEM; ThermoFisher Scientific®, EUA) suplementado con suero fetal bovino (FBS) al 2 % y antibióticos. Posteriormente fueron molidos con pistilos estériles de plástico y centrifugadas a 1400 rpm por 5 minutos a 4 °C en centrífuga fría; el sobrenadante fue colocado en un tubo de micro centrifugado.

Formación de conglomerados y extracción de RNA viral de arbovirus en Mosquitos

Se agruparon en conglomerados de 30-31 ejemplares, de cada conglomerado se tomaron 100 µl de muestra y se extrajo el ARN usando 500 µl de Trizol LS (Invitrogen®, EUA), siguiendo las instrucciones del fabricante.

Formación de conglomerados y extracción de RNA viral de arbovirus en muestras de Coatíes

Las muestras de sangre fueron centrifugadas y los sueros se agruparon en conglomerados de 10 muestras. De cada conglomerado se tomaron 100 µl de muestra y se extrajo el ARN usando 500 µl de Trizol LS (Invitrogen®, EUA), siguiendo las instrucciones del fabricante.

La concentración y la calidad del ARN de cada conglomerado fueron cuantificados usando valores de absorbancia 260/280 con un espectrofotómetro (Nanodrop 2000, Thermo Scientific®, EUA).

Transcripción Reversa y Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT-PCR)

La Transcripción Reversa (RT) se realizó con el kit ImProm-II Reverse (Promega®, EUA) bajo las instrucciones del fabricante. Se usaron los iniciadores específicos reversos de cada familia viral, para obtener un volumen final de 20µl en cada reacción; brevemente se describe el protocolo utilizado por reacción; una vez mezclado el RNA obtenido de cada conglomerado, se mezcló con el iniciador reverso de cada familia, se calentaron a 70° durante 5 min y posteriormente enfriados en hielo por 5 min. Finalmente se utilizaron las siguientes temperaturas: 25°C por 5 min, 42°C por 60 min y 70°C por 15 min para finalmente obtener el ADN complementario (ADNc).

Para llevar a cabo la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se usaron los iniciadores específicos de cada familia viral (cuadro 4) y la enzima *Taq* Polymerase kit (Invitrogen®, EUA), siguiendo las instrucciones del fabricante para obtener un volumen final de reacción de 25 µl, las condiciones de temperatura utilizadas para la amplificación del ADN de las reacciones para cada familia se muestran en el cuadro 5.

Para la familia *Flaviviridae*, se realizó un PCR anidado utilizando los volúmenes de reacción y enzima antes mencionados, para la primera PCR se utilizaron los iniciadores MAND y cFD2, para la segunda PCR se utilizaron los iniciadores cFD2 y FS778 que amplifican la región NS5 con un tamaño de 250pb siguiendo el protocolo descrito en los cuadros 4 y 5.

Cuadro 4.- Iniciadores específicos para las familias *Bunyaviridae*, *Flaviviridae* y *Togaviridae*.

Familia	Región	Tamaño	Iniciador	
<i>Bunyaviridae</i>	Glicoproteína G1	251 pb	BCS82 (F) BCS332V (R)	(Kuno <i>Et al.</i> 1996).
<i>Togaviridae</i>	proteína no estructural NSP1	98 pb	VIR966c (F) VIR966 (R)	(Eshoo <i>Et al.</i> 2007)
<i>Flaviviridae</i>			MAND (F)	
PCR	proteína no estructural NS5	250 pb	cFD2 (R) FS778 (F)	(Scaramozzino <i>Et al.</i> 2001)
PCR anidada			cFD2 (R)	

pb= Pares de bases; **F=** Forward; **R=** Reverse.

Cuadro 5.- Condiciones de temperatura utilizadas para la amplificación del ADN de las reacciones para las familias *Bunyaviridae*, *Flaviviridae* y *Togaviridae*.

Familia			Condiciones de termociclado				
<i>Bunyaviridae</i>	Incubación	---	Desnaturalización	94°C x 1 min	X 38 Ciclos	Inactivación	72°C x 5 min 12°C ∞
			Alineación	53°C x 1 min			
			Extensión	72°C x 1 min			
<i>Togaviridae</i>	Incubación	94°C x 3 min	Desnaturalización	94°C x 30 seg	X 29 Ciclos	Inactivación	72°C x 8 min 10°C ∞
			Alineación	50°C x 45 seg			
			Extensión	72°C x 2 min			
<i>Flaviviridae</i>	PCR	---	Desnaturalización	94°C x 1 min	X 25 Ciclos	Inactivación	72°C x 5 min 12°C ∞
			Alineación	53°C x 1 min			
			Extensión	72°C x 1 min			
PCR anidada	Incubación	---	Desnaturalización	94°C x 1 min	X 35 Ciclos	Inactivación	72°C x 5 min 10°C ∞
			Alineación	54°C x 1 min			
			Extensión	72°C x 1 min			

Como controles positivos se usó ADNc de virus Cache Valley (familia *Bunyaviridae*), encefalitis equina Venezolana TC-83 (familia *Togaviridae*) y virus Dengue tipo 1 (familia *Flaviviridae*) y se realizó la RT-PCR bajo la metodología antes descrita. Como control negativo se utilizó la mezcla de reacción de PCR sin adicionar ADNc.

Cuando los conglomerados mostraron amplificación de material genético, a las muestras que lo conformaron se les extrajo el ARN y se realizó la RT-PCR bajo la metodología previamente descrita para conocer el número real de muestras que presentaron evidencia de ARN viral de arbovirus.

Electroforesis en gel de agarosa

Los productos de reacción de PCR fueron examinados por electroforesis en geles de agarosa al 2% y teñidos con bromuro de etidio. Se utilizó un marcador molecular de 100 pb Gene Ruler DNA Ladder (Fermentas, Thermo Scientific®, EUA).

Secuenciación Genética

Los amplicones fueron purificados con el kit Wizard Purification Systems (Promega®, EUA) bajo las instrucciones del fabricante. Para comprobar que se realizó una purificación de ADN (sin contaminación) se repitió el protocolo de amplificación de PCR de las familias analizadas, usando el producto purificado y posterior electroforesis.

Las muestras purificadas fueron enviadas al Instituto de Biotecnología (IBT) de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) para determinar la secuencia genética e identificar el material genético viral detectado.

Identificación viral

El análisis de las secuencias se realizó utilizando BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) del NCBI y el programa ClustalW en GenBank y posterior análisis filogenético dentro de las herramientas del programa MEGA Versión 6 (Tamura et al. 2013). El análisis filogenético se realizó utilizando el método de inferencia evolutiva de Neighbor-Joining (Saitou y Nei 1987) con 1000 repeticiones como prueba de máxima parsimonia y máxima verosimilitud (Felsenstein 1985).

3.4. Parámetros de infección en coatíes.

La prevalencia de infección en coatíes se obtuvo calculando el porcentaje de muestras de coatíes positivos al análisis de RT-PCR, sobre el total de muestras de coatíes analizados por época y sitio de estudio (Martin et al. 1987).

3.5. Medidas de asociación epidemiológica (riesgo relativo) en coatíes

El riesgo relativo (rr) expresa las veces que es más probable la aparición del efecto (enfermedad) en individuos expuestos, que aquellos individuos que no están expuestos al factor de riesgo (Martin et al. 1987).

Se construyeron dos tablas de contingencia, la primera se usó para medir los factores de riesgos asociados al uso de suelo y ambientales y la segunda, para medir los factores de riesgo asociados a las poblaciones de coatíes muestreadas.

Se definió como grupo expuesto y no expuesto a los sitios (A o B) que presentaron mayor y menor riesgo de exposición a arbovirus (SMaREA y SMeREA) respectivamente.

Se definió como efecto (enfermedad) al número de coatíes positivos a la técnica de RT-PCR.

Factores de riesgo asociados al uso de suelo:

Grado de urbanización: Se asignó SMaREA al sitio que mostró mayor grado de urbanización (Brown et al. 2008; Leisham et al. 2014). Con ayuda de una fotografía espacial de los sitios de estudio (Google Earth PRO, 2016) se ubicó un centroide en cada sitio de estudio y se trazó una circunferencia de 10 km² con base en la distancia mínima del vuelo de *Ochlerotatus taeniorynchus* (Verdonschot y Besse-Lototskaya 2014) y por apreciación visual se observó el mayor o menor grado de desarrollo urbano dentro de cada circunferencia en cada sitio de estudio (Figuras 8 y 9).

Ochlerotatus taeniorynchus es la especie de mosquito con mayor rango de vuelo reportada en ésta investigación, por lo que es la que tiene mayor capacidad de dispersión para localizar presas y alimentarse.

Superficie de áreas verdes: Se asignó al SMaREA al de menor superficie de áreas verdes (Brown et al. 2008). Con ayuda de una fotografía espacial de los sitios de estudio (Google Earth PRO, 2016) se estimó la superficie en m².

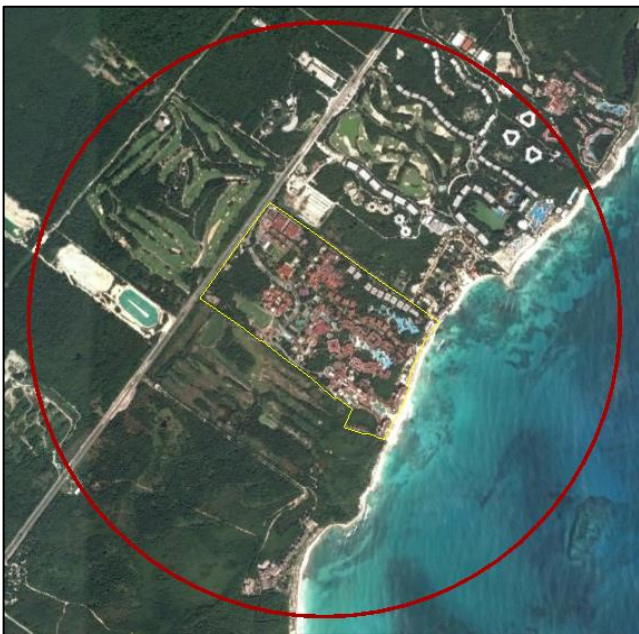


Figura 8. Imagen satelital del Sitio A, mostrando el grado de urbanización en un buffer de 10 km²



Figura 9. Imagen satelital del Sitio B, mostrando el grado de urbanización en un buffer de 10 km²

Factores de riesgo ambientales

Especies de Mosquitos: Se asignó como SMaREA en que se registró el mayor número de especies de mosquitos expresado como índice de riqueza específica y Margalef por sitio y época (Gratz 1999; Paz y Semenza 2013).

Estación de lluvias y secas: Se asignó a la época de lluvia como época de mayor abundancia de mosquitos y de mayor riesgo de exposición a arbovirus y la época de secas como época de menor abundancia de mosquitos (Leishnam et al. 2014; Monaghan et al. 2016). La época de secas comprendió los meses de enero a mayo y la estación de lluvias los meses de junio a diciembre de 2016.

Factores de riesgo asociados a las poblaciones de coatíes

Índice de abundancia relativa: Se asignó como SmaREA donde el índice de abundancia de abundancia relativa de coatíes fue mayor y SmeREA donde el índice de abundancia relativa de coatíes fue menor (Brown et al. 2008).

Clases de edad de los coatíes: La etapa adulta de los coatíes, se asignó como la etapa de mayor riesgo de exposición a picadura de mosquitos. Los individuos de las clases crías y juveniles se consideraron como grupos de menor riesgo de exposición. Este criterio está basado en la premisa que los organismos adultos tienen un mayor rango de dispersión (Gómez et al. 2008) que los segundos. Por otra parte, los adultos al poseer mayor masa corporal y generan mayor calor corporal, aumenta la probabilidad de ser picados por mosquitos hematófagos (Takken y Verhulst 2013).

3.6. Análisis estadísticos

Como unidades experimentales se consideraron a los coatíes y a los mosquitos capturados en cada sitio de muestreo.

Modelo de acumulación de especies de mosquitos hematófagos

Para evaluar el esfuerzo de muestreo y elaborar la curva de acumulación de especies, se unificó el número de especies colectadas por método de muestreo y la

unidad de esfuerzo usada fue horas-aspirado. Se realizó una curva de acumulación de especies por funciones de acumulación (Rarefacción exponencial, logarítmica y de Clench) como herramienta para el análisis de riqueza específica de muestras (Soberón y Llorente 1993). El mejor modelo se seleccionó usando el criterio de máxima verosimilitud y se calculó el valor de la asíntota y el esfuerzo adicional requerido (en unidades de esfuerzo) para registrar el 95 % de las especies (Jiménez-Valverde y Hortal 2003).

Las funciones de curva de acumulación de especies se realizaron con el programa Species Accumulation (Díaz y Soberón 2005).

Análisis de diversidad de mosquitos hematófagos

Se estimó la riqueza específica y diversidad de mosquitos con el índice de Margalef (Parra-Henao y Suárez 2012; Confalonieri y Costa Neto 2012; Thongsripong et al. 2013). El índice de diversidad de Margalef, fue seleccionado para estimar la diversidad en una comunidad con base en la distribución numérica de los individuos de las diferentes especies en función del número de individuos existentes en la muestra analizada (Moreno 2001). La estructura se midió a través del índice de dominancia de Berger-Parker que mide la proporción de las especies más comunes en una comunidad o muestra (Juliao et al. 2010; Parra-Henao y Suárez 2012). Los indicadores de diversidad se analizaron con el Programa Past 3.14 (Hammer et al. 2001).

Abundancia relativa de mosquitos hematófagos

La abundancia relativa de mosquitos se obtuvo como la proporción de la abundancia total correspondiente a cada especie (Thongsripong et al. 2013).

Se cuantificó el número de total de mosquitos colectados por ambos métodos de colecta y se diferenciaron por sexo con un microscopio estereoscópico con base en las características morfológicas de cada especie y con el apoyo de claves taxonómicas (Darsie y Ward 2005).

Se contabilizó el número total de hembras colectadas por especie, estado de alimentación, época y sitio de estudio y se comparó la abundancia de hembras

colectadas de acuerdo a la clasificación del estado alimenticio por época y por sitio de estudio.

El estado de alimentación fue dividido en 2 clases: HNA: hembras no alimentadas y HA: hembras alimentadas de sangre (hembras recién alimentada, hembras alimentadas con sangre en proceso de digestión y hembras grávidas). La finalidad de conocer el número de HA respecto al total de hembras colectadas, fue estimar la disponibilidad de alimento en cada sitio de estudio, con base en la escala de Sella. Dicha escala, es un método visual simple y estandarizado para determinar la etapa de digestión de sangre (1= no alimentada; 2= Recién alimentada; 3-6= sangre parcialmente digerida; 7=hembra grávida) en las hembras colectadas (García-Rejón et al. 2011; Brugman et al. 2017).

En el método de Trampas Magoon, se comparó la abundancia de hembras y HA (para este análisis solo se consideraron a las hembras recién alimentadas con sangre) por sitio de estudio y época del año. Con éste método, se asume que las HA (recién alimentadas con sangre) se alimentaron del cebo vivo (coatí), aunque en éste trabajo no fue posible realizar los análisis de ADN correspondientes para confirmar el supuesto.

Para conocer si estas comparaciones tuvieron diferencia significativas, las medias fueron analizadas con una prueba T de student para muestras independientes ($p < 0.05$), cuando los datos presentaron una distribución normal; cuando los datos no presentaron distribución normal se usó el estadístico U de Mann – Whitney ($p < 0.05$).

Especies de mosquitos hematófagos asociados a coatíes en trampas Magoon

Para conocer que especies de mosquitos mostraron mayor asociación hacia los coatíes en las trampas Magoon, las hembras colectadas fueron clasificadas por especie, agrupadas en mosquitos No Culícidos (NC), especies pertenecientes a la tribu *Aedeomyiini* y *Manonina* (Subfamilia *Culicinae*) y Culícidos (C), especies pertenecientes a la tribu *Culicini* (Subfamilia *Culicinae*) y comparadas por época y sitio de estudio.

Para éste análisis, se asume que los NC tienen preferencia alimenticia hacia mamíferos (Kuno y Chang 2005) y los C preferencia ornitofílica (Hamer et al. 2009; Turell et al. 2001). Además, las hembras colectadas no fueron clasificadas por su estado de alimentación.

Para conocer si estas comparaciones tuvieron diferencia significativas, las medias fueron analizadas con una prueba T de student para muestras independientes ($p < 0.05$), cuando los datos presentaron una distribución normal; cuando los datos no presentaron distribución normal se usó el estadístico U de Mann – Whitney ($p < 0.05$).

Abundancia relativa de coatíes

La abundancia relativa se obtuvo como capturas por unidad de esfuerzo como Noches -Trampa (Número de trampas/Muestreos-Día/Días de Muestreo/Sitio/Época).

Se comparó la abundancia relativa para conocer si existieron diferencias significativas por efecto de la época y sitio de estudio. Para conocer si estas comparaciones tuvieron diferencia significativas, las medias fueron analizadas con una prueba T de student para muestras independientes ($p < 0.05$), cuando los datos presentaron una distribución normal; cuando los datos no presentaron distribución normal se usó el estadístico U de Mann – Whitney ($p < 0.05$).

Medidas de asociación epidemiológica (riesgo relativo)

El riesgo relativo se calculó de la división de la prevalencia acumulada de individuos positivos sobre la prevalencia acumulada de individuos negativos con respecto a las variables establecidas como factores de riesgo (expuestos y no expuesto) con una tabla de contingencia y análisis de χ^2 con corrección de Yates y prueba exacta de Fisher a dos colas ($p = < 0.05$). El cálculo de intervalo de confianza (IC) fue del 95 % = $RR^1 \pm 1.96 \sqrt{X^2}$. Para la validación de los resultados obtenidos se utilizó el intervalo de confianza, con un 95 % de confiabilidad (Cuadro 6).

Los datos fueron analizados con los programas SPSS versión 22 (SPSS Inc, Chicago, EUA, 2013), Epiinfo versión 7.2.01 (CDC, EUA 2016) y WinEpi (Universidad de Zaragoza, España 2016).

Cuadro 6. Interpretación del valor de riesgo relativo (rr) con base en los límites inferiores y superiores del intervalo de confianza.

Rr=1, el factor de riesgo no tiene influencia en la aparición de la enfermedad, no hay asociación causal.

Rr>1, pero el límite inferior del IC es mayor que 1, hay asociación causal.

Rr>1, pero el límite inferior del IC es igual o menor que 1, hay asociación, pero no causal.

Rr<1, pero el límite superior del IC es mayor que 1, hay asociación no protectora.

Rr<1, pero el límite superior del IC es menor que 1, la asociación es protectora.

Rr=Riesgo relativo; IC=Intervalo de Confianza al 95 %.

4. Resultados

4.1. Mosquitos hematófagos

4.1.1. Esfuerzo de muestreo y modelos de acumulación de especies

El esfuerzo de muestreo para el método de aspirado fue de 192 horas-aspirado (96 horas-aspirado por sitio en ambas épocas), para el método de trampas Magoon, el esfuerzo de captura fue de 72 noches-trampa (36 noches-trampa por sitio en ambas épocas de lluvias y secas).

El modelo de acumulación de especies que mejor se ajustó a los datos fue el de Clench, siendo éste dos veces mejor que el modelo exponencial y 1633 veces que el logarítmico. No se alcanzó la asíntota (12 especies), el esfuerzo adicional necesario para lograrlo es de 1118 horas-aspirado. La proporción de especies registradas fue del 84 % (cuadro 7 y figura 10).

Cuadro 7. Modelos de acumulación de especies evaluados para estimar la riqueza de especies en los sitios A y B.

Modelo	A	B	L	LR	1/LR	Asíntota	S _{Obs}	% Reg.	$\Delta t_{0.95}$
Clench	0.203	0.017	-2.516	1	1	12	10	84	1118
Exponencial	0.135	0.012	-3.398	0.413	2	11	10	90	1557
Logarítmico	11.3	1.17	-9.914	0.0006	1633	10	10	104	16

A y B = Parámetros ajustados; **L** = Verosimilitud del modelo; **LR** = Relación de verosimilitud de cada modelo con respecto al mejor de ellos; **1/LR** = Inverso de la relación entre la verosimilitud del modelo respectivo y el mejor modelo; **S_{Obs}** = Riqueza observada; **% Reg.** = Proporción de fauna registrada **$\Delta t_{0.95}$** = Esfuerzo adicional en horas-aspirado requerido para alcanzar el 95 % de la asíntota.

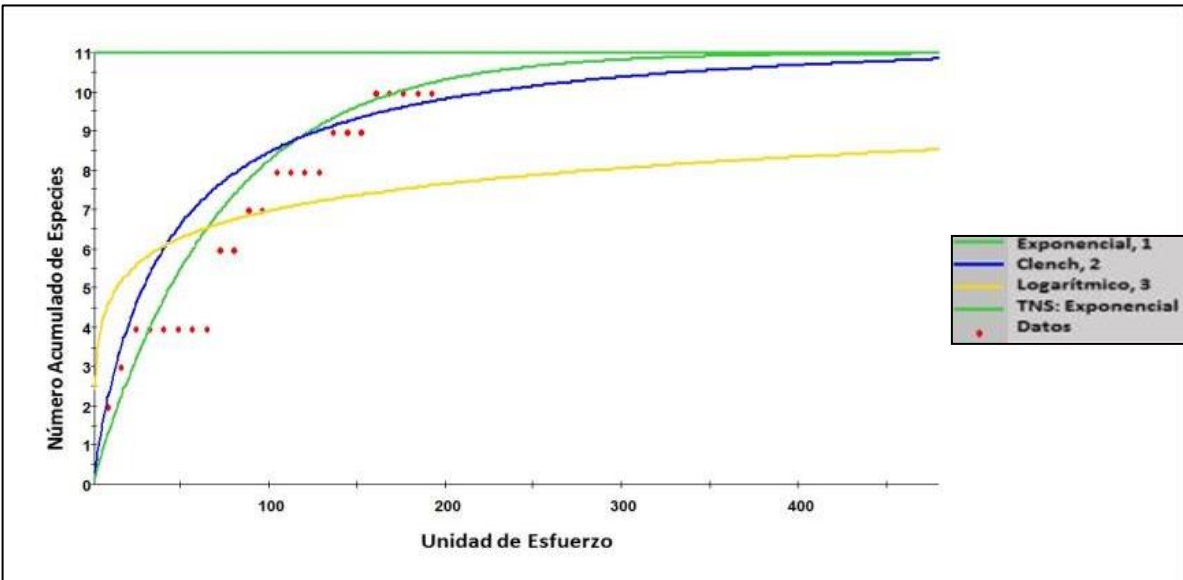


Figura 10. Curva de acumulación de especies (rarefacción) observada y estimada por los modelos Clench, Exponencial y Logarítmicos para estimar la riqueza de especies en los Sitios A y B. Las unidades de esfuerzo están expresadas en horas de aspirado.

4.1.2. Análisis de diversidad de mosquitos hematófagos

En total se colectaron 5,580 mosquitos de siete géneros y 10 especies. Se registraron siete y ocho especies para A y B respectivamente, esta diferencia fue significativa ($t = -2.510$, $df = 46$, $p = 0.016$). Por efecto de época no se encontraron diferencias significativas en el número de especies registradas por sitio de estudio (A: $U = 53.500$, $Z = -1.157$, $p = 0.247$; B: $U = 45.000$, $Z = -1.623$, $p = 0.105$).

A través del índice de Margalef, la diversidad de especies fue mayor en B en comparación con A. Por época, en el sitio A, la diversidad fue menor en secas en comparación con la época de lluvias. En el sitio B, la diversidad fue similar en época de secas y lluvias.

De acuerdo con el índice de Berger-Parker, la dominancia de especies fue similar en A y B. Por época, En A, se registró menor dominancia en secas en comparación con la época de lluvias. En B, la dominancia de especies fue similar en la época de lluvias y secas (cuadro 8).

Cuadro 8. Indicadores de diversidad (riqueza y estructura) de especies de mosquitos (hembras y machos) colectados por época de secas y lluvias en los sitios A y B.

Indicadores de diversidad	A			B		
	Secas	Lluvias	General	Secas	Lluvias	General
Especies	4	7	7	6	7	8
Índice de Margalef (D_{mg})	0.4617	0.7585	0.7381	0.7481	0.8276	0.9092
Índice de Berger-Parker (d)	0.6310	0.9149	0.8038	0.6959	0.7188	0.7105

Las especies más abundantes fueron *Ochlerotatus taeniorhynchus*, *Cx. quinquefasciatus* y *Ae. aegypti*. La abundancia en A (n= 3,369) no mostró diferencias significativas al compararla con B (n=2,211; $U= 44.00$, $Z= -1.617$, $p= 0.106$). En A, las especies más abundantes fueron: *Ochlerotatus taeniorhynchus* (81%), *Cx. quinquefasciatus* (14%) y *Ps. ferox* (4%). En B, fueron: *Cx. quinquefasciatus* (71%); *Ae. aegypti* (15%) y *Cx. nigripalpus* (9%). Ver cuadro 9

Cuadro 9. Abundancia absoluta y relativa de las especies de mosquitos hematófagos colectados en los sitios A y B durante época de secas y lluvia.

Sitio	A						B							
	Época		Secas ^c		Lluvias ^c		Total ^e		Secas ^d		Lluvias ^d		Total ^e	
Especies de Mosquitos	N	%AR	N	%AR	N	%AR	N	%AR	N	%AR	N	%AR	N	%AR
<i>Aedes aegypti</i>	15	2.3	3	0.11	18	0.53	203	25.47	132	9.34	335	15.15		
<i>Anopheles albimanus</i>	1	0.2	1	0.04	2	0.06	0	0	1	0.07	1	0.05		
<i>Culex quinquefasciatus</i>	419	62.9	56	2.07	475	14.10	556	69.76	1012	71.57	1568	70.92		
<i>Ochlerotatus taeniorhynchus</i>	231	34.6	2,494	92.27	2725	80.88	26	3.26	58	4.10	84	3.80		
<i>Culex interrogator</i>	0	0	10	0.37	10	0.30	0	0	0	0	0	0		
<i>Psorophora ferox</i>	0	0	138	5.11	138	4.10	0	0	0	0	0	0		
<i>Culex nigripalpus</i>	0	0	0	0	0	0	1	0.13	196	13.86	197	8.91		
<i>Mansonia titillans</i>	0	0	1	0.04	1	0.03	8	1.00	11	0.78	19	0.86		
<i>Haemagogus equinus</i>	0	0	0	0	0	0	3	0.38	0	0	3	0.14		
<i>Aedes fulvus pallens</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	4	0.28	4	0.18		
	666	100	2,703	100	3,369	100	797	100	1,414	100	2,211	100		
Total			3,369							2,211				5,580

N=tamaño de muestra **%AR**=Abundancia Relativa expresada en porcentaje; **c**= $U= 17$, $Z= -0.160$, $p= 0.873$; **d**= $t= -2.532$, $df= 10$, $p= 0.030$; **e**= $U= 44.00$, $Z= -1.617$, $p= 0.106$

4.1.3. Caracterización de la muestra de mosquitos hematófagos

Colecta general de mosquitos hematófagos

De 5,580 mosquitos colectados, el 71 % fueron machos y 29 % hembras; el 36 % de las hembras se encontraron alimentadas con sangre.

La abundancia de hembras fue significativamente menor en A (n=623) que en B (n=986; $t = -2.204$, $df = 22$, $p = 0.038$); también, la abundancia de hembras alimentadas en A (n=79) fue menor que en B (n=496; $t = -6.342$, $df = 22$, $p = 0.001$). Por efecto de época, la abundancia de hembras y hembras alimentadas en A y en B, no mostraron diferencias significativas (Cuadro 10).

Cuadro 10. Abundancia de mosquitos hematófagos colectados en A y B en época de secas y lluvias, mostrando las abundancias de colecta por sexo y estado de alimentación.

Sitio	Época	Machos	Hembras	HNA	HA	Total
A	Secas	319	347 ^C	307	40 ^D	666
	Lluvias	2427	276 ^C	237	39 ^D	2,703
	Total	2,746 (82%) ^G	623^A (18%)	543	79^B	3,369 (100%)
B	Secas	316	481 ^E	209	272 ^F	797
	Lluvias	909	505 ^E	281	224 ^F	1,414
	Total	1,225 (55%) ^G	986^A (45%)	490	496^B	2,211 (100%)
Gran Total		3,971 (71%) ^G	1,609 (29%)	1033 (64%)	575 (36%)	5,580 (100%)

HNA= Hembras No Alimentadas; **HA=** Hembras Alimentadas; **A=** $t = -2.204$, $df = 22$, $p = 0.038$; **B=** $t = -6.342$, $df = 22$, $p = 0.001$; **C=** $t = 0.730$, $df = 10$, $p = 0.480$; **D=** $t = 0.150$, $df = 10$, $p = 0.885$; **E=** $t = 0.311$, $df = 10$, $p = 0.762$; **F=** $t = 0.734$, $df = 10$, $p = 0.480$. **G=** Los valores porcentuales representan cifras en sentido horizontal.

Método de aspirado

Se colectó un total de 5,157 mosquitos de seis especies y cinco géneros, 75 % machos y 25 % hembras. La abundancia de hembras colectadas en A (n=545), no

mostró diferencias significativas al compararla con B ($n= 748$; $t= -1.418$, $df= 22$, $p= 0.170$). En el Sitio A el 7 % de las hembras se encontró en algún estado de alimentación; en tanto que en el sitio B el 48 % se encontraron alimentadas o grávidas. La abundancia de hembras alimentadas fue significativamente menor en A ($n=39$) que en B ($n=363$; $t= -6.45$, $df= 22$, $p= 0.000$).

Por efecto de época, la abundancia de hembras y hembras alimentadas en A y en B, no mostraron diferencias significativas (Cuadro 11, Anexos 4 y 5).

Cuadro 11. Abundancia de mosquitos hematófagos colectados por método de aspirado en A y B, en época de secas y lluvias; se muestran las abundancias de colecta por sexo y estado de alimentación.

Sitio	Época	Machos	Hembras	HNA	HA	Total
A	Secas	310	317 ^C	289	28 ^D	627
	Lluvias	2425	228 ^C	217	11 ^D	2653
	Total	2,735 (83%) ^G	545^A (17%)	506	39^B	3,280 (100%)
B	Secas	289	379 ^E	183	196 ^F	668
	Lluvias	840	369 ^E	202	167 ^F	1209
	Total	1,129 (60%) ^G	748^A (40%)	385	363^B	1,877 (100%)
Gran Total		3,864 (75%) ^G	1,293 (25%)	891 (69%)	402 (31%)	5,157 (100%)

HNA= Hembras No Alimentadas; **HA=** Hembras Alimentadas; **A=** $t= -1.418$, $df= 22$, $p= 0.170$; **B=** $t= -6.45$, $df= 22$, $p= 0.000$; **C=** $t= 0.945$, $df= 10$, $p= 0.367$; **D=** $t= 1.653$, $df= 10$, $p= 0.129$; **E=** $t= 0.088$, $df= 10$, $p= 0.932$; **F=** $t= 0.574$, $df= 10$, $p= 0.579$. **G=** Los valores porcentuales representan cifras en sentido horizontal.

Método por trampas Magoon

Se colectó un total de 423 mosquitos de nueve especies y siete géneros; 25 % machos y 75 % hembras, el 13 % se encontraron recién alimentadas (HA).

La abundancia de hembras colectadas en A ($n=78$) fue significativamente menor a la del sitio B ($n=238$; $U= 37.50$, $Z= -1.996$, $p= 0.046$). Por efecto de época, la abundancia de hembras y hembras recién alimentadas en A, no mostraron diferencias

significativas; en B, la abundancia de hembras no mostró diferencias significativas, sin embargo, el número de hembras recién alimentadas en secas (n=3) fue significativamente menor que en lluvias (n=16; $U= 04.50$, $Z= -2.242$, $p= 0.025$). Ver cuadro 12, anexos 6 y 7.

Cuadro 12. Abundancia de mosquitos hematófagos colectados por método trampas Magoon en A y B, y época de secas y lluvias; mostrando las abundancias de colecta por sexo y estado de alimentación.

Sitio	Época	Machos	Hembras	HA	Total
A	Secas	9	30 ^B	7 ^C	39
	Lluvias	2	48 ^B	15 ^C	50
	Total	11 (12%) ^F	78^A (88%)	22 (28%) ^G	89 (100%)
B	Secas	27	102 ^D	3 ^E	129
	Lluvias	69	136 ^D	16 ^E	205
	Total	96 (29%) ^F	238^A (71%)	19 (8%) ^G	334 (100%)
Gran Total		107 (25%) ^F	316 (75%)	41 (13%) ^G	423 (100%)

HA= Hembras Alimentadas; **A=** $U= 37.50$, $Z= -1.996$, $p= 0.046$; **B=** $U= 8.00$, $Z= -1.615$, $p= 0.106$; **C=** $U= 10.50$, $Z= -1.260$, $p= 0.208$; **D=** $t= 0.467$, $df= 10$, $p= 0.650$; **E=** $U= 04.50$, $Z= -2.242$, $p= 0.025$. **F=** Los valores porcentuales representan cifras en sentido horizontal. **G=** Fracción porcentual de hembras A2 respecto al total de hembras.

Especies de mosquitos asociados a coatíes en trampas Magoon

En el sitio A en la época de secas, las especies C (Culícidos) se conformó por *Cx. quinquefasciatus* (n=13), en tanto que las especies NC (No Culícidos) se conformaron por *Ochlerotatus taeniorhynchus* (n=17). En la época de lluvias las especies C fue conformada por *Cx. quinquefasciatus* (n=22), en tanto que las especies NC por *Ae. aegypti* (n=1), *An. albimanus* (n=1), *Mn. titillans* (n=1), *Ochlerotatus taeniorhynchus* (n=18) y *Ps. ferox* (n=5).

En el sitio B en la época de secas, las especies C se conformaron por *Cx. quinquefasciatus* (n=78), en tanto que las especies NC por *Ae. aegypti* (n=1), *Hg. equinus* (n=3), *Mn. titillans* (n=2) y *Ochlerotatus taeniorhynchus* (n=18). En la época de

lluvias las especies C se conformaron por *Cx. quinquefasciatus* (n=61) y *Cx. nigripalpus* (n=14), en tanto que las especies NC por *Ae. fulvus pallens* (n=4), *Mn. titillans* (n=7) y *Ochlerotatus taeniorhynchus* (n=50). No se encontraron diferencias significativas por sitio y época del año (ver cuadro 13).

Cuadro 13. Especies de mosquitos Culícidos (C) y No culícidos (NC) asociados a trampas Magoon en los sitios A y B, en época de secas y lluvias

		Secas	Lluvias	Total
Sitio		Hembras	Hembras	Hembras
A	NC	17 ^D	26 ^E	43 ^F
	C	13	22	35
B	NC	24 ^G	61 ^H	85 ^I
	C	78	75	153

NC= No Culícidos; **C=** Culícidos; **D=** U= 11.50, Z= -1.071, p= 0.284; **E=** t= -0.357, df= 10, p= 0.729; **F=** t= -1.288, df= 22, p= 0.211; **G=** U= 11.50, Z= -1.050, p= 0.294; **H=** t= 0.769, df= 10, p= 0.460; **I=** U= 11.50, Z= -1.050, p= 0.294

4.2. Coatíes

4.2.1. Abundancia relativa de coatíes

El esfuerzo de muestreo total fue de 216 noches-trampa y se capturaron 160 coatíes en ambas épocas y sitios (40 coatíes por sitio y época). En A, se registró un esfuerzo de muestreo de 80 noches-trampa e Índice de Abundancia relativa (IAR) de 1.00; en B se registró un esfuerzo de muestreo de 136 noches-trampa e IAR de 0.49.

Durante la época de lluvias en B, se capturaron 27 ejemplares por trampa y 13 por captura directa (ejemplares encontrados enfermos, con signología nerviosa, incoordinación, bajo peso, deshidratación, diarrea, secreción ocular, nasal, entre otros signos) que también fueron muestreados y marcados. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el IAR por efecto de sitios y época (Cuadro 14).

Cuadro 14. Índice de abundancia relativa (IAR; coatíes/noche-trampa) de coatíes en A y B, en las épocas de secas y lluvias.

Sitio	Época	DC	NT	Rango Captura	Total Coatíes	IAR
A	Secas	11	44	0-11	40	0.91 ^b
	Lluvias	9	36	0-17	40	1.11 ^b
	Total	20	80	0-17	80	1^a
B	Secas	19	76	0-8	40	0.5 ^c
	Lluvias	15	60	0-6	27	0.45 ^c
	Total	34	136	0-8	67 (+13^d)	0.49^a

DC= Días de captura; **NT**= Noches trampa; **IAR**= Índice de Abundancia Relativa, expresado en coatíes por noche-trampa; **a**= $U= 261$, $Z= -1.486$, $p= 0.137$; **b**= $U= 46.50$, $Z= -0.237$, $p= 0.813$; **c**= $U= 135.500$, $Z= -0.258$, $p= 0.797$; **d**=Número de coatíes colectados por captura directa en época de lluvias, suman 80 para el sitio B.

4.2.2. Caracterización de la muestra de coatíes

En A se muestrearon 42 hembras (52.5% H) y 38 machos (47.5% M), el grupo se conformó por 27 crías (H=12, M=15; 34%), 29 juveniles (H=13, M=16; 36%) y 24 adultos (H=17, M=7; 48%). En B, se muestrearon a 33 H (41%) y 47 M (59%), el grupo se conformó por 14 crías (H=4, M=10; 18%), 17 juveniles (H=10, M=7; 21%) y 49 adultos (H=19, M=30; 61%). Los valores promedio de peso y largo total para cada grupo de coatíes capturados por época y sitio se presentan en anexos 8 y 9.

De acuerdo con el análisis de poder estadístico post-hoc, el poder alcanzado con una muestra de 160 coatíes fue de 0.93 (1-beta) con un nivel de confianza del 95 % y $df=2$ (éxito de captura promedio de 2.72 ± 3.46 coatíes por noche – trampa).

4.2.3. Evaluación general del estado de salud

En el sitio A los ejemplares se encontraron con un buen estado de salud aparente. Durante la época de secas, la prevalencia de lesiones externas fue de 7.5 % (n=3) involucrando únicamente a hembras y para la época secas fue de 2.5 % (n=1) en una cría macho (Cuadro 15). Las frecuencias de lesiones externas registradas en A fueron: sobrepeso (n=2), bajo peso (n=1) y diarrea (n=1).

Cuadro 15. Prevalencia de lesiones externas en coatíes por sexo y etapa de vida en el sitio A durante la época de secas y lluvias. Abreviaciones **SL:** Sin lesiones; **CL:** Con lesiones.

Estación	Etapa	Hembras	SL	CL	Machos	SL	CL	Total
Secas	Cría	0	0	0	0	0	0	0
	Juvenil	13	12	1	11	11	0	24
	Adulto	13	11	2	3	3	0	16
	Total	26	23 (57.5%)	3 (7.5%)	14	14(35%)	0	40 (100%)
Lluvias	Cría	12	12	0	15	14	1	27
	Juvenil	0	0	0	5	5	0	5
	Adulto	4	4	0	4	4	0	8
	Total	16	16 (40%)	0	24	23 (57.5%)	1 (2.5%)	40 (100%)

Referente al sitio B, los ejemplares muestreados en época de secas se encontraron en aparente buen estado de salud, la prevalencia de lesiones externas fue de 7.5 % (n= 3) en hembras y 5 % (n=2) en machos, encontrando cuatro ejemplares con heridas en proceso de cicatrización y uno con alopecia. En la época de lluvias se registraron 25 coatíes enfermos (16 H y 12 M) con signos sugerentes a Distemper canino (Cuadro 16). La frecuencia de lesiones fue bajo peso (n=15), caquéticos (n=4), diarrea (n=21), salivación (n=6), tos/estornudos (n=2), secreción nasal (n=11), secreción ocular (n=23), incoordinación (n=9), alopecia (n=12), debilidad (n=11), hiperqueratosis plantar (n=9) y deshidratación (n=9).

No se registró ninguna muerte de coatíes derivado del proceso de captura, sedación y colecta de muestras.

Cuadro 16. Prevalencia de lesiones externas en coatíes por sexo y etapa de vida en el sitio B durante la época de secas y lluvias. Abreviaciones **SL:** Sin lesiones; **CL:** Con lesiones.

Estación	Etapa	Hembras	SL	CL	Machos	SL	CL	Total
Secas	Cría	0	0	0	0	0	0	0
	Juvenil	5	3	2	6	6	0	11
	Adulto	6	5	1	23	21	2	29
	Total	11	8 (20%)	3(7.5%)	29	27 (67.5%)	2 (5%)	40 (100%)
Lluvias	Cría	4	3	1	10	1	9	14
	Juvenil	5	0	5	1	0	1	6
	Adulto	13	3	10	7	5	2	20
	Total	22	6 (15%)	16 (40%)	18	6 (15%)	12(30%)	40 (100%)

4.3. Resultados de RT-PCR

Se extrajo el ARN de 1,609 muestras de mosquitos agrupadas en 54 conglomerados y de 160 muestras de suero de coatíes agrupadas en 16 conglomerados. Se realizaron 210 reacciones de RT-PCR en total y 70 reacciones por familia. No se observó amplificación de material genético en los conglomerados de mosquitos para las familias *Bunyaviridae*, *Flaviviridae* y *Togaviridae*.

Para la familia *Bunyaviridae* (Kuno et al. 1996), se observó amplificación de ARN viral de longitud aproximada de 250 pares de bases (pb) en dos conglomerados de coatíes correspondientes a la época de secas (sitio A, carril 38 y sitio B, carril 36), ver figura 11. Respecto a la familia *Flaviviridae* (Scaramozzino et al. 2001), se observó amplificación de ARN viral de longitud aproximada de 250 pb en dos conglomerados (sitio A en época de secas, carril 29 y sitio B en época de lluvias, carril 26), ver figura 12. Para la familia *Togaviridae*, no se observó amplificación de ARN viral.

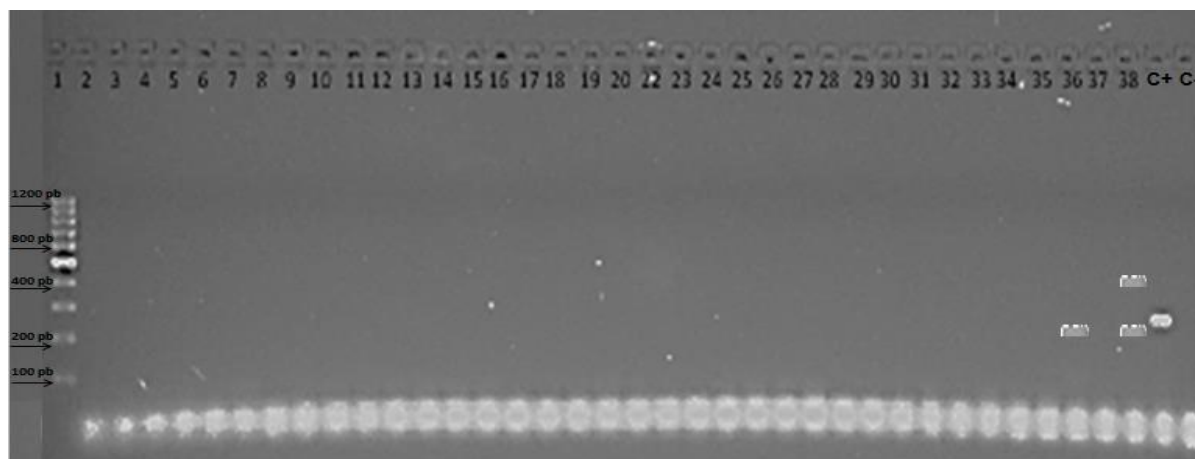


Figura 11. Gel de agarosa mostrando amplicones obtenidos a partir del análisis de RT-PCR para la familia *Bunyaviridae* (Kuno Et al. 1996) en muestras por conglomerados de suero de coatí. En el carril 1 se muestra el marcador de peso molecular de 100 a 1200 pb. En los carriles 2 al 35 y 37 corresponden a conglomerados de mosquitos y suero de coatíes sin evidencia de ARN viral. En el carril 36 se muestra un conglomerado de suero de coatíes con evidencia de ARN viral con longitud aproximada de banda de 250 pb correspondiente al sitio B. En el carril 38 se muestra un conglomerado de suero de coatíes con evidencia de ARN viral con longitud aproximada de banda de 250 pb correspondiente al sitio A y amplificación de material genético con longitud aproximada de 500 pb. En el carril 39 muestra el control positivo (virus Cache Valley) y el carril 40 muestra el control negativo, agua libre de ARNasas.

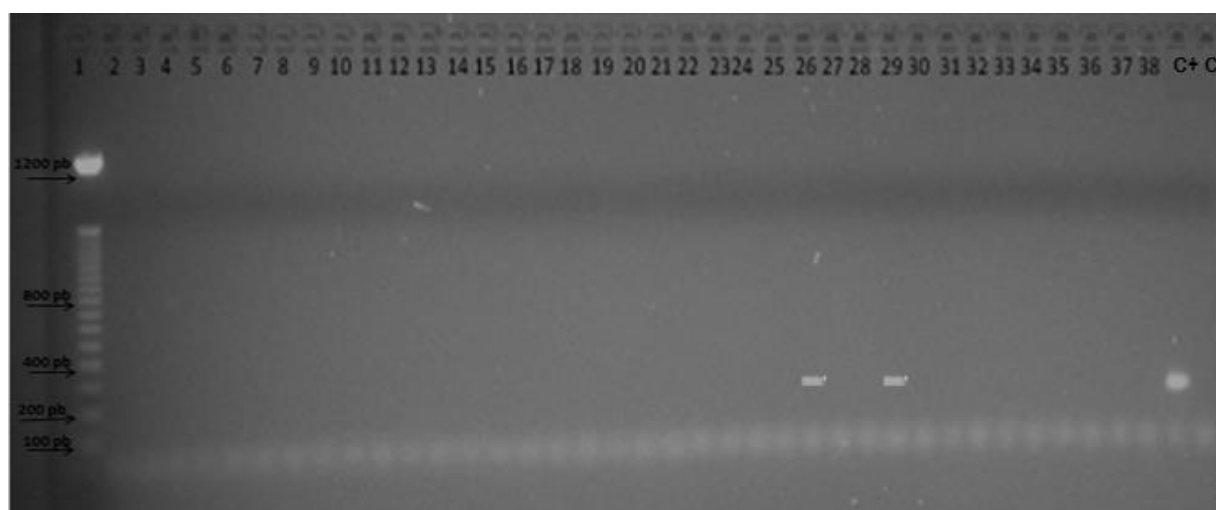


Figura 12. Gel de agarosa mostrando amplicones obtenidos a partir el análisis de RT-PCR para la familia *Flaviviridae* (Scaramozzino et al. 2001) en muestras por conglomerados de suero de coatí. En el carril 1 se muestra el marcador de peso molecular de 100 a 1200 pb. Los carriles 2 al 22 corresponden a conglomerados de mosquitos sin evidencia de ARN viral. Los carriles 23 al 25, 27, 28 y 30 al 38 corresponden a conglomerados de suero de coatíes sin evidencia de ARN viral. En los carriles 26 y 29 se muestran conglomerados de suero de coatíes con evidencia de ARN viral con longitud aproximada de banda de 250 pb correspondientes a los sitios B en época de lluvias y al sitio A en época de secas respectivamente. El carril 39 muestra el control positivo (virus Cache Valley) y el carril 40 muestra el control negativo, agua libre de ARNasas.

De los dos conglomerados de suero de coatí que mostraron evidencia de ARN viral (longitud aprox. de banda de 250 pb) para la familia *Bunyaviridae*; el correspondiente al sitio A en época de secas, evidenció amplificación de ARN viral en una muestra correspondiente a hembra adulta (carril 2, figura 13). El segundo conglomerado correspondiente al sitio B en época de secas, evidenció la amplificación de ARN viral en dos muestras colectadas de un coatí macho juvenil y una hembra adulta respectivamente (Carriles 2 y 10, figura 14).

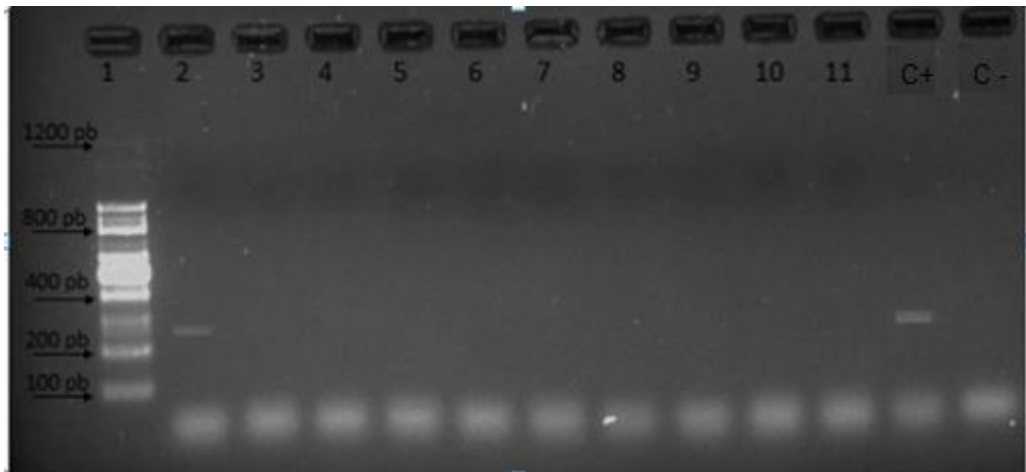


Figura 13. Gel de agarosa mostrando amplicones obtenidos a partir el análisis de RT-PCR para la familia *Bunyaviridae* (Kuno et al. 1996) en muestras individuales de suero de coatí. En el carril 1 se muestra el marcador de peso molecular de 100 a 1200 pb. En el carril 2 se muestran un suero de coatí hembra adulta con evidencia de ARN viral con longitud aproximada de banda de 250 pb correspondientes al sitio A en época de secas. En los carriles 3 al 11, se muestran sueros de coatíes sin evidencia de ARN viral correspondientes al sitio A en época de secas. El carril 12 muestra el control positivo (virus Cache Valley) y en carril 13 muestra el control negativo, agua libre de ARNasas.

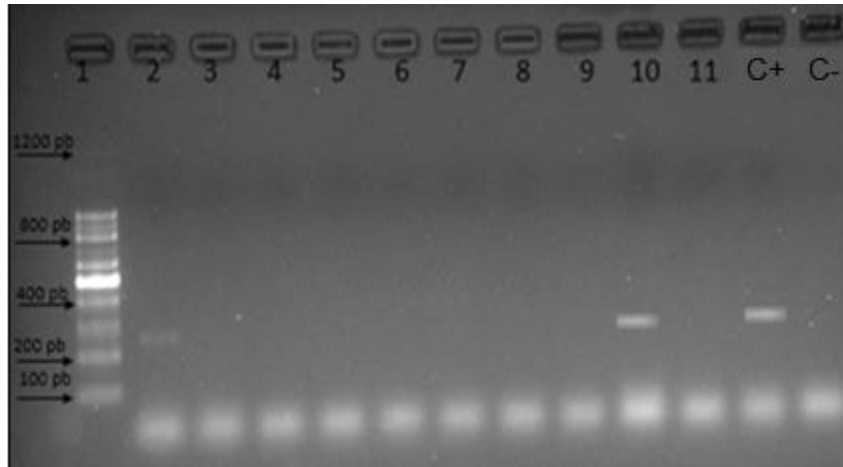


Figura 14. Gel de agarosa mostrando amplicones obtenidos a partir el análisis de RT-PCR para la familia *Bunyaviridae* (Kuno et al. 1996) en muestras individuales de suero de coatí. En el 1 se muestra el marcador de peso molecular de 100 a 1200 pb. En los carriles 2 y 10, se muestran sueros de un coatí macho juvenil y una hembra adulta respectivamente, con evidencia de ARN viral con longitud aproximada de banda de 250 pb correspondientes al sitio B en época de secas. En los carriles 3 al 9 y 11, se muestran sueros de coatíes sin evidencia de ARN viral correspondientes al sitio B en época de secas. El carril 12 muestra el control positivo (virus Cache Valley) y en el carril 13 muestra el control negativo, agua libre de ARNasas.

Referente a la familia *Flaviviridae*, de los dos conglomerados que mostraron evidencia de ARN viral (longitud aproximada de banda de 250 pb); el correspondiente al sitio A en época de secas, evidenció amplificación de ARN viral en dos muestras colectadas de un coatí macho adulto y una hembra adulta (Carriles 4 y 6, figura 15). El segundo conglomerado correspondiente al sitio B en época de lluvias, mostró evidencia de amplificación de ARN viral en una muestra colectada de un macho adulto (Carril 4, figura 16).

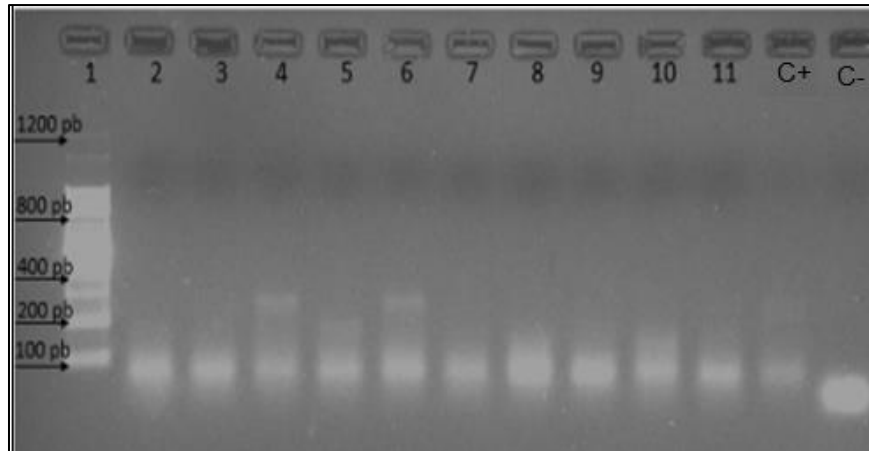


Figura 15. Gel de agarosa mostrando amplicones obtenidos a partir el análisis de RT-PCR para la familia *Flaviviridae* (Scaramozzino et al. 2001) en muestras individuales de suero de coatí. En el carril 1 se muestra el marcador de peso molecular de 100 a 1200 pb. En los carriles 4 y 6 se muestran sueros de un coatí macho adulto y una hembra adulta respectivamente, con evidencia de ARN viral con longitud aproximada de banda de 250 pb correspondiente al sitio A en época de secas. Los carriles 2, 3, 5, 7 al 11 muestran sueros de coatíes sin evidencia de ARN viral que corresponden al sitio A en época de secas. El carril 12 muestra el control positivo (virus Dengue tipo 1) y en el carril 13 muestra el control negativo, agua libre de ARNasas.

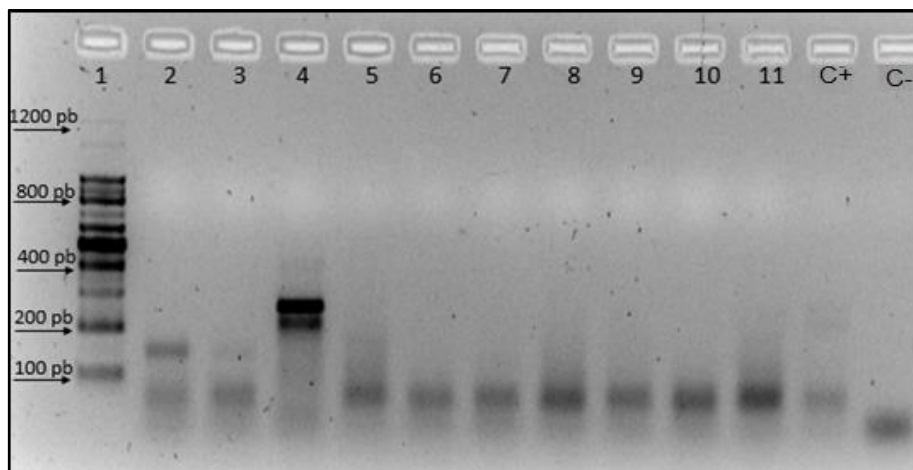


Figura 16. Gel de agarosa mostrando amplicones obtenidos a partir el análisis de RT-PCR para la familia *Flaviviridae* (Scaramozzino et al. 2001) en muestras individuales de suero de coatí. En el carril 1 se muestra el marcador de peso molecular de 100 a 1200 pb. En el carril 2 se muestra amplificación de material genético con longitud aproximada de banda de 150 pb. En los carriles 3, 5 al 11 se muestran sueros de coatíes sin evidencia de ARN viral que corresponden al sitio B en época de lluvias. En el carril 4 se muestra un suero de coatí macho adulto con evidencia de ARN viral con longitud aproximada de banda de 250 pb correspondiente al sitio B en época de lluvias y amplificación de material genético con longitud aproximada de banda de 200 pb. El carril 12 muestra el control positivo (virus Dengue tipo 1). El carril 13 muestra el control negativo, agua libre de ARNasas.

4.4. Prevalencias de infección

No se encontró evidencia de ARN viral en los mosquitos muestreados. En los coatíes, en el sitio A, se reportó una prevalencia del 2.5 % (n=2/80) para la familia *Flaviviridae* y para la familia *Bunyaviridae*, una prevalencia del 1.25 % (n=1/80). En el sitio B, se reportó una prevalencia del 1.25 % (n=1/80) para la familia *Flaviviridae* y para la familia *Bunyaviridae* una prevalencia del 2.5 % (n=2/80).

4.5 Secuencias genéticas

Tres muestras por conglomerados de coatíes y sus respectivos controles positivos, fueron secuenciadas (anexo 10).

Respecto a la familia *Bunyaviridae*, se enviaron los dos amplificadores de PCR y fueron denominados CM_MEX.QROO02 (correspondiente a un coatí, sitio A) y DM_MEX.QROO01 (correspondiente a dos coatíes, sitio B). El control positivo de virus Cache Valley se denominó ECBUNYAMEXYUCHNLA.

A través del análisis de BLAST, las secuencias genéticas CM_MEX.QROO02 (237 pb), DM_MEX.QROO01 (215 pb) y ECBUNYAMEXYUCHNLA (248 pb) comparten un 97% de identidad con el virus Bunyamwera (número de acceso GenBank: NC_001927.1). Las secuencias recuperadas del GenBank con las cuales tuvieron altas similitudes fueron aislados en países como Argentina, Canadá, Ecuador, Estados Unidos y México, entre los años de 1964 y 2011 de diferentes especies de mosquito tales como *Ochlerotatus taeniorhynchus* (número de acceso GenBank: EU879062, donde se aisló virus Cholul), *Ochlerotatus albifasciatus* (número de acceso GenBank: KM205207, donde se aisló virus Bunyamwera), y otros mosquitos en general (números de acceso GenBank: KP835933.1, KP835926.1, KP835933, KP835928.1, KP835929.1; donde se aislaron virus Cache Valley y Playa). La comparación de las secuencias obtenidas compartió 97% de identidad con virus Cholul y 96% con virus Playa y Cache Valley.

El análisis filogenético demostró que las secuencias obtenidas (círculo negro en el árbol filogenético) se agruparon >50% de las repeticiones de la prueba de bootstrap. La secuencia DM_MEX.QROO01 comparte un ancestro común con el virus Bunyamwera, serotipos Cache Valley y virus Playa en el 60% de las repeticiones;

mientras que CM_MEX.QRR02, aparentemente más distante, en el 70% de las repeticiones se agrupa en una rama externa con el mismo virus y serotipos que DM_MEX.QROO01. La secuencia de referencia (número de acceso GenBank: NC_004110.1) de La Crosse virus resultó como un grupo externo (figura 17).

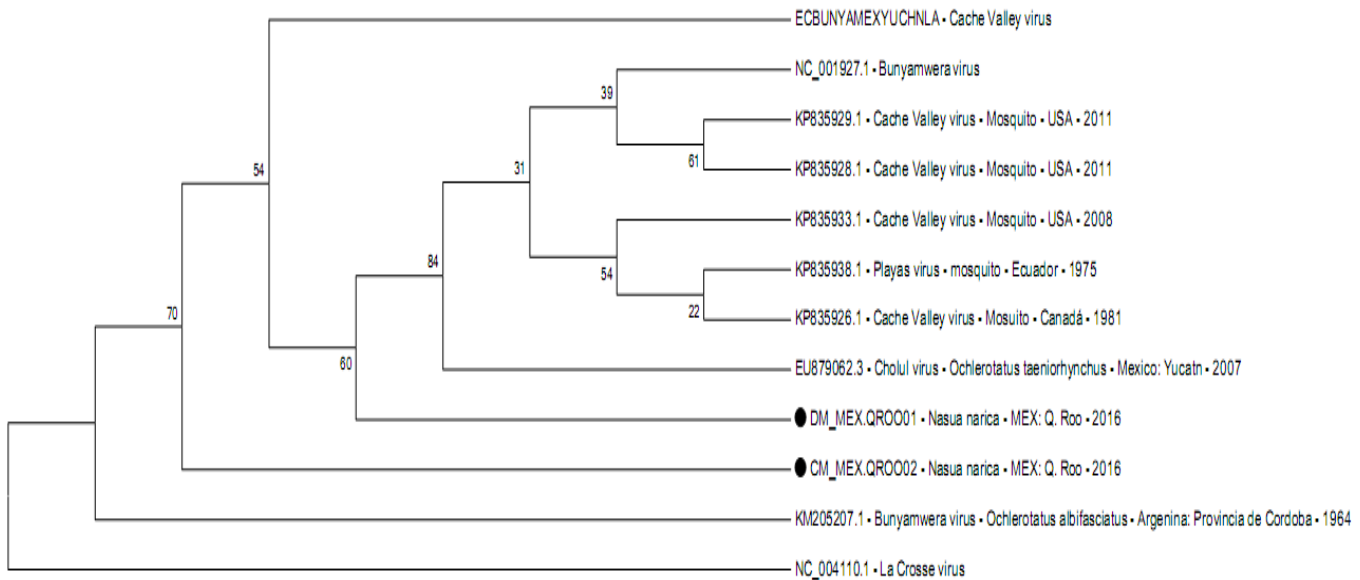


Figura 17. Análisis filogenético de DM_MEX.QROO01 y CM_MEX.QROO02. NC_001927.1: secuencia de referencia de Bunyamwera virus. ECBUNYAMEXYUCHNLA: control de referencia para *Orthobunyavirus*. DM_MEX.QROO01 y CM_MEX.QROO02: secuencias aisladas en este estudio. Las secuencias comparadas se representan en el árbol filogenético con: el Número de acceso de GenBank – Virus aislado - Hospedero donde fue aislado – Lugar donde se aisló el virus – año de aislamiento. Números corresponden al porcentaje de repeticiones donde la topología del árbol filogenético fue la misma.

Para la familia *Flaviviridae*, se secuenció un amplificado de PCR denominado AM_MEX.QROO01 (correspondiente a un coatí, sitio B). El control positivo de virus Dengue tipo 1 se denominó DENV1MEXYUCHNLA.

A través del análisis de BLAST, la secuencia genética AM_MEX.QROO01 (105 pb) comparte un 99% de identidad con el virus del Oeste del Nilo (número de acceso GenBank: NC_001563.2). Las secuencias recuperadas del GenBank con las cuales tuvo una alta similitud, fueron aislados en Estados Unidos, específicamente en Nueva York e Illinois entre 2004 y 2007 en especies como *Corvus brachyrhynchos* (número de acceso GenBank: NC_001927.1HM488191.1, HQ671730.1), *Culex sp.* (número de acceso GenBank: NC_001927.1KX547426.1, KX547452.1, KX547388.1) y *Culiseta sp.* (número de acceso GenBank: NC_001927.1KX547375.1).

El análisis filogenético demostró que la secuencia genética (círculo negro en el árbol filogenético) se agrupó en un 57% de las repeticiones de la prueba de bootstrap dentro del conjunto de secuencias correspondientes a virus del Oeste del Nilo; mientras que la secuencia control de virus Dengue tipo 1 resultó como un grupo externo (figura 18).

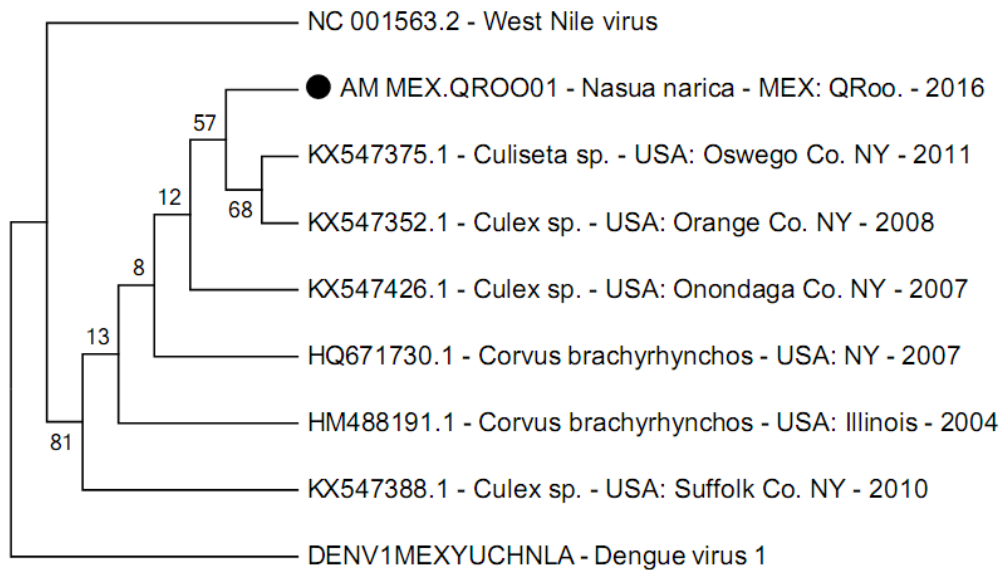


Figura 18. Análisis filogenético AM_MEX.QROO01. Inferencia evolutiva de relaciones taxonómicas realizada por el método de Neighbor-Joining con 1000 réplicas de la prueba de bootstrap. NC_001563.2: secuencia de referencia de virus del Oeste del Nilo; DENV1MEXYUCHNLA: secuencia de referencia de virus Dengue tipo 1; AM_MEX.QROO01: secuencia aislada en este estudio. Las secuencias comparadas se representan en el árbol filogenético con: el Número de acceso de GenBank – Hospedero donde fue aislado – Lugar donde se aisló la secuencia – año de aislamiento.

4.6 Medidas de asociación epidemiológica (riesgo relativo) en coatíes

Factores de riesgos asociados al uso de suelo:

Grado de urbanización: El SmaREA (sitio con mayor riesgo de exposición a arbovirus) fue A y el SMeREA (sitio con menor riesgo de exposición a arbovirus) fue B. De acuerdo con el análisis de las imágenes satelitales, el sitio A presenta un mayor grado de urbanización (conformado por hoteles, centros vacacionales y campos de golf) en comparación con B.

Superficie de áreas verdes: El SmaREA fue B y el SMeREA fue A. El sitio A posee una superficie aproximada de 78.56 hectáreas, de las cuales, 47.17 ha (60.00 %) corresponden a áreas verdes (predominan áreas ajardinadas con vegetación exótica y

césped, parches de manglar y acahuales de selva baja). El sitio B posee una superficie aproximada de 117 hectáreas, de las cuales, 107.71 ha (92.00 %) corresponden a áreas verdes (predominan áreas de acahuales de selva baja).

Factores de riesgos ambientales:

Época de lluvias y secas: La época de lluvia se asignó como época de mayor exposición y abundancia de mosquitos y secas como época de menor abundancia de mosquitos.

Especies de Mosquitos: El SMaREA fue B, por contar con el mayor número de especies de mosquitos y SMeREA fue A.

Factores de riesgo asociados a las poblaciones de coatíes por sitio de estudio:

Índice de abundancia relativa: El SMaREA fue A por tener un mayor índice de abundancia relativa, en la época de lluvias se registró el mayor IAR de coatíes. El SMeREA fue B, en la época de secas se registró el mayor IAR de coatíes.

Estrato de Edad de Coatíes: Se asignó a la etapa adulta con grupo de mayor riesgo de exposición y las etapas de crías y juveniles como grupos de menor riesgo de exposición.

Época de lluvias y secas: La época de lluvia se asignó como época de mayor exposición y abundancia de mosquitos y secas como época de menor abundancia de mosquitos.

La construcción de las tablas de contingencia con los factores de riesgo, el número de coatíes positivos a arbovirus por la técnica de RT-PCR agrupados entre los grupos expuestos y no expuestos se presentan en la figura 19.

Figura 16 a. Tabla de contingencia para factores de riesgo asociados al uso de suelo y ambientales.				Figura 16 b. Tabla de contingencia para factores de riesgo asociados a los coatíes por sitio de estudio			
Factores de Riesgo		RT-PCR		Factores de Riesgo		RT-PCR	
Uso de Suelo	Grado de Urbanización	+	-	Sitio A	Índice de Abundancia Relativa (IAR)	+	-
	Expuesto: A	3	77		Expuesto: Mayor IAR (Lluvias)	0	40
	No Expuesto: B	3	77		No Expuesto: Menor IAR (Secas)	3	37
	Áreas verdes				Época		
	Expuesto: B	3	77		Expuesto: Lluvias	0	40
	No Expuesto: A	3	77		No Expuesto: Secas	3	37
Ambientales	Especies de Mosquitos			Estrato de edad			
	Expuesto: B	3	77	Expuesto: Adultos	2	38	
	No Expuesto: A	3	77	No Expuesto: Juveniles y crías	1	39	
	Época			Índice de Abundancia Relativa (IAR)			
	Expuesto: Lluvias	1	79	Expuesto: Mayor IAR (Secas)	1	39	
	No Expuesto: Secas	5	75	No Expuesto: Menor IAR (Lluvias)	2	38	
			Sitio B	Época			
			Expuesto: Lluvias	Expuesto: Adultos	2	38	
			No Expuesto: Secas	No Expuesto: Juveniles y crías	1	39	
			Estrato de edad				
			Expuesto: Adultos	Expuesto: Adultos	2	38	
			No Expuesto: Juveniles y crías	No Expuesto: Juveniles y crías	1	39	

Figura 19. Tablas de contingencia para factores de riesgo asociados al uso de suelo, ecológicos y poblaciones de coatíes en cada sitio de estudio.

No se encontró asociación causal en ninguno de los factores de riesgo establecidos y el número de coatíes positivos por RT-PCR para arbovirus, puesto que el intervalo de confianza en todos los casos contiene a 1 (cuadro 17).

Cuadro 17. Asociación epidemiológica (riesgo relativo) para la ocurrencia de arbovirus (familia *Bunyaviridae* y *Flaviviridae*) en coatíes en los sitios A y B.

Factores de Riesgo		rr	IC (95%)	X²	F
Uso de Suelo	Grado de Urbanización	1	0.2080 - 4.8068	0	$f=<1.00$
	% de Áreas Conservadas				
Ambientales	Especies de Mosquitos	1	0.2080 - 4.8068	0	$f=<0.20$
	Época	2	0.0239 - 1.6739	1.5584	$f=<0.24$
	Índice de Abundancia Relativa	0	NA	1.3853	$f=<0.24$
	A	Época	2	0.1888 - 21.1851	0
	Estrato de Edad Coatíes				
	Índice de Abundancia Relativa	0.5	0.047 - 5.296	0	$f=<1.00$
B	Época	2	0.1888 - 21.1851	0	$f=<1.00$
	Estrato de Edad Coatíes				

RR= Riesgo Relativo; **IC=** Intervalo de Confianza; **X²=** Prueba de Chi Cuadrado con corrección de Yates; **f=** nivel de significancia al 95% con corrección exacta de Fisher.

5 Discusión

Esta investigación aporta la primera evidencia de detección de ARN viral por la técnica molecular RT-PCR de VON y virus del serogrupo Bunyamwera, serotipos Cache Valley y Cholul en muestras de sangre de coatíes silvestres. Por otra parte, no se encontró evidencia de ARN viral en las muestras de mosquitos analizadas y tampoco se encontró asociación epidemiológica entre los factores de riesgo y la prevalencia de infección encontrada en las muestras de coatíes.

Análisis de RT-PCR positivos en coatíes

Los hallazgos de ARN viral para ambas familias de arbovirus, tienen validez y representación estadística para las poblaciones de coatíes muestreadas, debido al poder estadístico alcanzado (93%) con el tamaño de muestra analizado, ya que éste es superior al mínimo aceptado (80 %) en investigaciones biomédicas (García-García et al. 2013).

El producto de secuenciación referente a VON en la muestra de coatí, tiene como ancestro común al linaje 1 de VON de la cepa aislada (NY-99-flamingo382-99; número de acceso a GenBank: AF196835.2) en el brote de NY, EUA en 1999 (Lanciotti et al. 1999; McMullen et al. 2011). Los hallazgos de VON en mamíferos silvestre y cautivos (entre ellos prociénidos y mamíferos peri-domésticos) son variables dependiendo de la técnica de detección empleada, el tamaño de muestra analizado y el sitio de estudio. Es importante señalar que no se conoce cuál es el papel de la mayoría de los mamíferos silvestres en la ecología de VON (Root et al. 2005).

La prevalencia de detección de VON en ésta investigación, difiere con lo reportado por Hidalgo-Martínez et al. (2008) al no detectar ARN viral por RT-PCR en 21 muestras de 11 especies mamíferos silvestres, cautivos en un zoológico de Tabasco; pero al analizar las mismas muestras por la técnica de ELISA de bloqueo con anticuerpos dirigidos a VON, reportaron una seroprevalencia de 46.71%. Este estudio incluyó dos muestras de mapaches (*Procyon lotor*), también prociénidos que resultaron negativos a ambos análisis. Farfa-Alé et al (2006) reportaron una seroprevalencia de VON de 3.8% por la técnica de NRNP en 52 muestras mamíferos cautivos de 11 especies (incluyendo 8 mapaches y 4 coatíes negativos al análisis), en un zoológico de Yucatán.

En contrastante, en EUA, VON ha sido reportado por la técnica de NRNP, en mamíferos peri-domésticos como mapaches (*Procyon lotor*), tlacuaches (*Didelphis virginiana*) y ardillas (*Sciurus carolinensis* y *Sciurus niger*) con altas seroprevalencias (desde 30 hasta el 100 %) con tamaños de muestra variables (Root et al. 2005; Blitvich et al. 2009).

Por otro lado, en México, VON ha sido reportado por la técnica de RT-PCR y NRNP en diferentes especies silvestres y domésticas con prevalencias de infección variables. En aves domésticas y silvestres las prevalencias reportadas oscilan entre el 0.5 % y el 33 % (Fernández-Salas et al. 2003; Hidalgo-Martínez et al. 2008; Ulloa et al. 2009; Cortés-Guzmán et al. 2013; Chaves et al. 2016), en comparación con reptiles, las prevalencias de infección reportadas son superiores y van del 30 % hasta el 85.7 % (Hidalgo-Martínez et al. 2008; Machain-Williams et al. 2013). En mamíferos silvestres cautivos, las prevalencias de infección oscilan entre el 3.8 % hasta el 34.48 % (Farfán-Ale et al. 2006; Hidalgo-Martínez et al. 2008) y en equinos con prevalencias de entre 31.6 % y el 62.5 % (Blitvich et al. 2003; Farfán-Ale et al. 2006; Padilla et al. 2009; Ulloa et al. 2009; Cortés-Guzmán et al. 2013). En humanos, las prevalencias de infección reportadas van del 40.4 % hasta el 79.5% con la técnica de ELISA de captura para IgC (Fernández-Salas et al. 2007); mientras que los vectores de VON (*Cx. quinquefasciatus*, *Cx. nigripalpus* y *Cx. interrigator*) las prevalencias de infección reportadas son muy bajas (0.25% al 2.94%) por la técnica de RT-PCR (Hidalgo-Martínez et al. 2008; Ulloa et al. 2009). Estos reportes provienen de los estados de Coahuila, Nuevo León, Sonora, Chihuahua, Tamaulipas, Puebla, Guerrero, Tabasco, Chiapas, Yucatán y Quintana Roo.

Por otro lado, los Orthobunyavirus son virus endémicos de América y muchas partes del mundo (Edwards 1994; Horne y Vanlandingham 2014) y recientes hallazgos indican que están ampliamente distribuidos en la Península de Yucatán (Farfan-Ale et al. 2009; Farfan-Ale et al. 2010; Blitvich et al. 2012a; Blitvich et al. 2012b; Blitvich et al. 2012c). Respecto al serotipo Cholul, éste se descubrió en Cholul, Yucatán en 2007 en un conglomerado de mosquitos *Ochlerotatus taeniorhynchus*; los análisis filogenéticos

indican que es un virus reagrupado naturalmente que adquirió su segmento S de virus Cache Valley y sus segmentos M y L del virus Potosí (Blitvich et al. 2012c).

Dentro del serogrupo del virus Bunyamwera, el serotipo Cache Valley probablemente sea el más estudiado (Edwards 1994; Horne y Vanlandingham 2014) y tiene importancia sanitaria en el campo de la medicina veterinaria pues está implicado en muertes embrionarias, abortos y malformación en rumiantes salvajes y domésticos (Edwards 1994; Calisher y Sever 1995; Sahu et al. 2002). Sin embargo, no se conocen los efectos en mamíferos no ungulados (Hubélak et al. 2014).

En la península de Yucatán se reporta amplia distribución de los serotipos Cache Valley (9.7%-26.4%), Cholul (19.3%-33%) y otros Orthobunyavirus (51.6%) en animales domésticos de producción con altas seroprevalencias por la técnica de NRNP (Blitvich et al. 2012b). Las prevalencias de infección reportadas en México, son similares a las reportadas en el medio Oeste de EUA, para el serotipo Cache Valley en venados (*Odocoileus virginianus*) silvestres (39-91%) y de cautiverio (>66%) (Neitzel y Grimstad 1991; Blackmore y Grimstad 1998). De manera similar, el ganado bovino proveniente del Noreste, Norte de EUA y Alaska, presentó seroprevalencia de Cache Valley por la técnica de NRNP de 4-28% (Sahu et al. 2002). En contraste con mamíferos no ungulados, la prevalencia de Cache Valley por la técnica de NRNP en zorras desérticas (*Vulpes velox*) y zorritas del desierto (*Vulpes macrotis*) provenientes de EUA, fue de 5% (Miller et al. 2000) y de 12.5% en liebres de California (*Lepus californicus*), muestreadas en el Norte de México. (Aguirre et al. 1992).

Con base en los datos antes mencionados, la prevalencia de detección de ARN Viral reportada en ésta investigación, no puede ser comparada plenamente con los hallazgos reportados en la literatura, debido a que los estudios de seroprevalencia realizados con distintas técnicas de ELISA y NRNP están diseñados para realizar monitoreo epidemiológico de enfermedades en poblaciones susceptibles o bien para el diagnóstico de enfermedades en fase aguda o crónica por cuantificación de antígenos o anticuerpos (Scott et al. 2001). En tanto que la técnica de RT-PCR, es usada para la detección de ARN viral y confirmación de enfermedad en pacientes en fase de viremia aguda (CDC 2013).

Por lo que la elección de la técnica de RT-PCR como herramienta de detección de arbovirus en coatíes, fue una limitante para conocer el número real de coatíes expuestos a arbovirus. Aunque la RT-PCR, es una técnica altamente sensible y específica, también es de bajo rendimiento e ineficiente si las muestras no son colectadas en fase de viremia aguda, por lo que no debe considerarse en programas de vigilancia epidemiológica (CDC 2013).

Por otro lado, los análisis de secuenciación genética permitieron identificar al arbovirus evidenciado con la técnica de RT-PCR, sin embargo, dichas secuencias genéticas no pudieron ser ingresadas a la base de datos de GenBank y generar sus respectivos números de acceso, pues para el ingreso de nuevas secuencias, el NCBI menciona que secuencias menores a 200 nucleótidos de largo no son aceptadas a menos que representen exones completos, RNA no codificantes, microsatélites o ADN ancestral. Sin embargo, la construcción de los árboles filogenéticos permitieron identificar al ancestro común de las secuencias de VON y virus del serogrupo Bunyamwera; pero las pruebas de máxima parsimonia y máxima verosimilitud, no fueron suficientemente robustas (Felstein 1985; Saitou y Nei 1987) para discernir relaciones o procesos evolutivos entre las secuencias que mostraron similitud y fueron usadas para el análisis filogenético y las reportadas en el presente trabajo (May et al. 2011). Además de que para poder relacionar dichos procesos evolutivos es necesario aislar al arbovirus y secuenciar su genoma completo (May et al. 2011).

Análisis de RT-PCR negativos en mosquitos.

La ausencia de ARN viral de arbovirus en mosquitos analizados por la técnica de RT-PCR, concuerda con algunos reportes en México y la Península de Yucatán, en donde las prevalencias de detección de arbovirus han sido muy bajas o nulas por la técnica de RT-PCR o aislamiento viral.

Referente a la detección de VON por la técnica de RT-PCR, Hidalgo-Martínez et al. (2008) reportaron en Tabasco, el 2.94% (n=1/34) de conglomerados de *Cx. quinquefasciatus* positivos de una muestra de 1,202 mosquitos. En Chiapas, Ulloa et al. (2009) reportaron el 0.25% (n=2/800) de conglomerados de *Cx. nigripalpus* y *Cx. interrogator* fue positivo de una muestra 32,000 mosquitos. En Guerrero, ningún

conglomerado fue positivo de una muestra de 4,854 mosquitos de 16 especies agrupados en 116 conglomerados (Cortés-Guzmán et al. 2013).

En la Península de Yucatán, no se han reportado mosquitos positivos a VON por RT-PCR o aislamiento viral, en muestras de 12,496 mosquitos agrupados en 458 conglomerados de *Cx. quinquefasciatus* (Farfan-Ale et al. 2009) y en 7,009 mosquitos agrupados en 201 conglomerados de *Cx. quinquefasciatus* (Farfan-Ale et al. 2009; Farfan-Ale et al. 2010). Respecto a *Orthobunyavirus* reportados en la Península de Yucatán, únicamente el 0.11 % (n=3/2,730) de conglomerados de una muestra de 79,236 mosquitos hembras de 26 especies, fueron positivos y se aislaron virus Cache Valley, Kairi y otro virus no determinado en mosquitos de *Ochlerotatus taeniorhynchus* (Farfan-Ale et al. 2009). En otro estudio, el 0.3 % (n=18/6,009) de conglomerados de mosquitos de 24 especies fueron positivos, 17 correspondieron a Cache Valley y un conglomerado a virus South River en muestras de *Ochlerotatus taeniorhynchus* (Farfan-Ale et al. 2010).

El tamaño de muestra alcanzado (n=1609) en esta investigación, fue notablemente diferente a lo reportado por Farfan-Ale et al. (2009) y Farfan-Ale et al. (2010). Ésta diferencia se debió al método de colecta usado; los autores usaron trampas Mosquito Magnet (American Biophysics Corp., North kingstown, RI, EUA), con un rango de acción mayor a 4000 m², emiten CO₂ y octenol como atrayente; teniendo mayor capacidad para capturar más especímenes en comparación con las mochilas aspiradoras; Sin embargo, las trampas que emiten CO₂ están indicadas para monitoreos epidemiológicos con *Culex spp.* (CDC 2013), pero son menos eficientes para capturar *Aedes spp.* (ADHS 2016). El uso de mochilas aspiradoras proporciona una buena representación de la estructura poblacional de los mosquitos (hembras no alimentadas, alimentadas con sangre, grávidas y machos), pero exigen un mayor esfuerzo de colecta y trabajo intensivo debido a las bajas densidades de mosquitos en reposo que existe en la mayoría de los lugares y los tamaños de muestra suficientes a menudo son difíciles de alcanzar (CDC 2013).

Otros factores que pudieron intervenir en tamaño de muestra alcanzado, fueron las intensas prácticas de fumigación y limpieza de áreas observados en los sitios de estudio, pues prácticas sostenidas de fumigación y limpieza de áreas a lo largo del año,

favorece que las poblaciones de mosquitos con potencial vectorial sean bajas (Zhou et al. 2007; Weaver 2013).

La probabilidad de detección de arbovirus en poblaciones de mosquitos suele ser muy baja o ausente en la mayoría de los muestreos de vigilancia de infección en vectores (Gu y Novak 2004). Factores de diseño metodológico como el método de diagnóstico, el número de mosquitos por conglomerado, tamaño de muestra de mosquitos colectados con base en tasas mínimas o máximas de infección afectan la probabilidad de detección de arbovirus en mosquitos (Gu y Novak 2004).

Es factible suponer que los resultados negativos no se debieron a factores de diseño metodológico o diagnóstico. La técnica de RT-PCR usada es apropiada para la detección de ARN viral en poblaciones de vectores (CDC 2013), debido a que su especificidad y sensibilidad es del 100 %, al usar un máximo de 50 mosquitos por conglomerados (en éste estudio se usaron conglomerados de 30 mosquitos) para detectar a un espécimen positivo (Huang et al. 2001). Además, el protocolo de RT-PCR (método de extracción de ARN, cebadores seleccionados, elección de la transcriptasa reversa, ADN polimerasa y programa de termociclado) está estandarizado en el laboratorio donde se realizaron los análisis moleculares. Otros factores considerados fueron, el adecuado manejo de la cadena fría en los especímenes, tanto en campo como en el laboratorio, para evitar que el ARN viral existente se degradara (CDC 2013). La calidad de las muestras posterior a la extracción de ARN fue medida por espectrofotómetro (Nanodrop 2000, Thermo Scientific®, EUA), usando valores de absorbancia 260/280 cercanos a 2.0 para considerar muestras libres de contaminación por Trizol y absorbancia 260/230 cercanos a 2.0 – 2.2 para considerarlas libres de otros contaminantes y evitar interfieran con el análisis de PCR (ThermoScientific 2011).

Por otro lado, con el tamaño de muestra (1609 mosquitos hembra) alcanzado, se tuvo una probabilidad de detección de arbovirus alta (0.8), asumiendo que la tasa de infección de mosquitos por arbovirus es baja. Sin embargo, es recomendable coleccionar muestras superiores a 2,400 mosquitos para incrementar la probabilidad de detección de arbovirus (Gu y Novak 2004).

Para que los arbovirus se mantengan circulando entre los vectores, éstos deben de disponer de hospederos competentes para alimentarse de sangre infectada de

arbovirus (Day y Shaman 2003). Aunque también está reportada la transmisión vertical entre vectores (Weaver y Reisen 2010).

El 36% de las hembras de mosquito colectadas estuvieron alimentadas con sangre, cifra que nos da una idea de la disponibilidad de alimento en los sitios de estudio. Este hallazgo está dentro de los reportado por García-Rejón et al. (2011), quienes de una muestra de 7,964 mosquitos de cinco especies colectadas en escuelas primarias de Mérida Yucatán, reportan que el 70.1% de *Ae. Aegypti* y el 29.5% de *Cx. quinquefasciatus* estaban alimentadas de sangre. En contraste, Brugman et al (2017), reportaron que el 10.4% de una muestra de 20,666 mosquitos de 11 especies colectados en una reserva natural de Reino Unido, estaban alimentados con sangre.

Por otro lado, con base en el supuesto de que las hembras colectadas por el método de trampas Magoon se alimentaron de sangre de coatí, únicamente el 13% se alimentó de ellos. Este resultado podría indicar que los coatíes no sean presas preferidas por los mosquitos, probablemente por factores no conocidos en prociénidos (Takken y Verhulst 2013), pero para comprobarlo es necesario realizar investigación específica.

Los resultados negativos, probablemente se deban a una suma de factores ecológicos y antrópicos de los sitios de estudio, pues el éxito de transmisión de arbovirus depende de la abundancia de mosquitos (espacial y temporal), longevidad, estructura de edad de la población de mosquitos , disponibilidad de hospederos amplificadores para alimentarse, la capacidad vectorial y factores ambientales que modulan la capacidad vectorial (Mackenzie et al. 2004), su biología reproductiva y supervivencia (Day y Shaman 2003).

En otro orden de ideas, las especies de mosquitos reportadas en ésta investigación, están implicadas en la transmisión de arbovirus como VON y virus del serogrupo Bunyamwera (Swaddle y Calos 2008; Hamer et al. 2009). Algunos autores como Thongsripong et al. (2013) y Medeiros-Sousa et al. (2015), sugieren que la alta dominancia de especies con capacidad vectorial tiende a ser mayor en hábitat menos conservados en comparación con sitios mejor conservados, mientras que la diversidad es mayor en sitios mejor conservados lo que sugiere, de acuerdo con algunos autores que la pérdida de biodiversidad puede incrementar el riesgo para la salud humana y animal

Por otro lado, los resultados del análisis de especies de mosquitos asociados a trampas Magoon (C y NC) no proporcionó información robusta que pueda indicar si existe un cambio en la diversidad o preferencia de presas en los mosquitos (Ezenwa et al. 2006; Swaddle y Calos 2008; Hamer et al. 2009).

Es importante señalar que el tamaño de muestra de las especies de mosquitos colectados, posee validez estadística para representar la riqueza y diversidad de especies de las poblaciones de mosquitos estudiados (Jiménez-Valverde y Hortal 2003).

Asociación epidemiológica entre los factores de riesgo y la prevalencia de infección en coatíes

Los factores de riesgo seleccionados para realizar el análisis en ésta investigación están soportados en la literatura; sin embargo, no se encontró ninguna asociación epidemiológica, probablemente debido al bajo número de coatíes positivos a arbovirus con la técnica de RT-PCR. De modo que al agrupar al número coatíes positivos entre los expuestos y no expuestos, la comparación del análisis de riesgo relativo y prueba de X^2 no fueron significativos (Martin et al. 1987).

El factor de riesgo más evidente en Quintana Roo, es el cambio de uso de suelo por desarrollo de infraestructura turística y casas habitación, lo que ocasiona gradual pérdida de ecosistemas y su diversidad, que en adición a las alteraciones climáticas a nivel global, pueden favorecer la ocurrencia de arbovirus en la zona (Githeko et al. 2000; Gluber et al. 2001; Weaver 2006). Por otro lado, análisis filogenéticos de cepas aisladas de VON en el sur de México (Beasley et al. 2004), sugieren que una de las vías de ingreso de VON a México, fue por la Península de Yucatán, a través de aves migratorias provenientes de EUA (Estrada-Franco et al. 2003; McMullen et al. 2011).

Con base en lo anterior, es necesario profundizar investigaciones para conocer el efecto de estos factores de riesgo y realizar monitoreos epidemiológicos en aves residentes y migratorias para ahondar en la comprensión de la ecología de los arbovirus en la región.

Estado de salud e Índice de Abundancia Relativa (IAR) en coatíes

La signología encontrada en los coatíes enfermos en el sitio B en la época de lluvias, aparentemente corresponde a un brote de Distemper canino. Para confirmar el diagnóstico, muestras sanguíneas y de tejido serán enviadas a análisis.

Por otro lado, el IAR fue usado como un estimador del tamaño poblacional de coatíes en los sitios de estudio (Naranjo 2012). En el sitio A en comparación con el sitio B, en el primero se observó una sobre abundancia de coatíes en la época de lluvias (IAR=1.1), mientras que en el segundo no se presentó (IAR=0.5). Lo anterior se debió a que los coatíes fueron capturados por grupos de hasta 17 ejemplares por noche-trampa en el sitio A y hasta 8 ejemplares por noche-trampa en el sitio B; por ende, en el sitio A se requirieron menos días de captura y menor número de noches trampa que en el sitio B.

Este fenómeno, está asociado a que las poblaciones de coatíes en el sitio A, están más familiarizadas a la presencia humana, pues permiten ser tocados, alimentados en los restaurantes y residen en los alrededores de las habitaciones y restaurantes del hotel; lo que facilitó su ingreso a las trampas por efecto del alimento usado como atrayente. En tanto que en el sitio B, los coatíes rara vez interactúan con los visitantes y no tienen acceso a los restaurantes.

Además, conforme los ejemplares fueron capturados, muestreados y posteriormente liberados; éstos aprendieron el método de captura y alertaron al resto de la tropa; lo que ocasionó que el número de ejemplares capturados por noche-trampa disminuyera hasta que los ejemplares dejaron de entrar a las trampas.

Retos y problemáticas.

Finalmente, desde el punto de vista ecológico, las enfermedades emergentes transmitidas por vectores son complejas e involucran factores bióticos y abióticos que definen la intensidad, temporalidad y amplitud de los brotes (Day y Shaman 2003). Debido a ésta complejidad, aún existen muchos vacíos en la comprensión en la ecología de los arbovirus, sus vectores y sus hospederos; ante este panorama, Gu et al. (2008) proponen desarrollar y unificar estrategias adaptativas para la vigilancia epidemiológica de mosquitos, referentes al diseño de muestreos y el análisis de datos dos situaciones

específicas; la primera, para la detección de bajas y altas tasas de infección respectivamente.

Los programas de vigilancia deberán ser diseñados con base a objetivos específicos de vigilancia epidemiológica (brotes en humanos) y vigilancia ambiental (vectores y hospederos animales); puesto que cada estrategia plantea objetivos particulares, estos deberán ir de la mano de las técnicas de diagnósticos apropiadas, analizar la relación costo-beneficio y seleccionar el tipo de muestreo: ejemplares vivos, muertos o grupos centinelas. Estos estudios requieren de un laboratorio especializado con niveles de seguridad 2 y 3 (CDC 2013).

Desde una perspectiva sanitaria y vinculada con aspectos sociales y económicos de cada país, la amplitud y profundidad de la vigilancia epidemiológica de arbovirus difiere regionalmente y muchas áreas carecen por completo de recursos financieros puesto que no se cuenta con el capital suficiente para prevenir y controlar enfermedades por medio de drogas, estrategias de control de vectores o el diagnóstico y monitoreo de enfermedades para medir prevalencias y progresos en su control (Liang et al. 2015). Los principales retos para el control de estas enfermedades es la implementación de programas de control exitosos que involucren a la comunidad, gobierno y al sector académico (Spiegel et al. 2005; Liang et al. 2015).

6 Conclusiones

1.- El uso de la técnica de RT-PCR en suero de coatíes, demostró evidencia de ARN viral de las familias *Flaviviridae* y *Bunyaviridae*, los análisis de secuenciación genética corresponden a VON y virus del serogrupo Bunyamwera, serotipos Cache Valley y Cholul respectivamente. Éste hallazgo tiene validez y representación estadística para las poblaciones de coatíes muestreadas.

2.- El uso de la técnica de RT-PCR en mosquitos, no demostró evidencia de ARN viral de arbovirus.

3.- La riqueza y diversidad encontrada en la muestra de mosquitos colectada, corresponde a ambientes perturbados como los sitios de estudio. Los indicadores de diversidad encontrados, tienen validez y representación estadística para las poblaciones de mosquitos de los sitios de estudio.

4.- El análisis de especies de mosquitos asociados a trampas Magoon (C y NC) no proporcionó información robusta que pueda indicar si existe un cambio en la diversidad o preferencia de presas en los mosquitos.

5.- Las medidas de asociación epidemiológica en poblaciones de coatíes, no tuvieron validez estadística, debido a que el número de ejemplares con evidencia de ARN viral no fue suficiente para mostrar diferencias significativas.

6.-A pesar de no poder demostrar asociación epidemiológica; aparentemente los sitios poseen factores bióticos y abióticos que favorecen la circulación de arbovirus (VON y Bunyamwera). Sin embargo, es necesario realizar más estudios de vigilancia epidemiológica en vectores y hospederos potenciales para ampliar el conocimiento en la dinámica de transmisión de arbovirus y su relación con la diversidad de aves silvestres, mamíferos, patrones de alimentación de vectores y variables ambientales.

7.- La contribución de este trabajo, se enfoca en dar la pauta para estudiar las poblaciones de mamíferos peridomésticos en Quintana Roo y conocer su papel en la ecología de la transmisión de arbovirus emergentes. Es el primer reporte de VON y virus Bunyamwera en coatíes silvestres en México y dado que ésta especie es de hábitos sinantrópicos, el riesgo de transmisión de arbovirus a poblaciones humanas en un polo de desarrollo turístico en México, no puede pasar inadvertido.

7. Referencias

- Aguilar-Setién A, Romero-Almaraz M, Sánchez-Hernández C, Figueroa R, Juárez Palma L, García-Flores M, Vázquez-Salinas C, Salas-Rojas M, Hidalgo-Martínez A, Aguilar Pierlé S, García-Estrada C. (2008). Dengue virus in Mexican bats. *Epidemiology and Infection*, 136(12), pp.1678–1683.
- Aguirre A. (2009). Wild canids as sentinels of ecological health: a conservation medicine perspective. *Parasites & Vectors*, 2 Suppl 1, S7. <http://doi.org/10.1186/1756-3305-2-S1-S7>
- Aguirre A, McLean R, Cook R, Quan T. (1992). Serologic survey for selected arboviruses and other potential pathogens in wildlife from Mexico. *Journal of Wildlife Diseases*, 28(3), pp.435–442.
- (ADHS) Arizona Department of Health Services (2016). Arizona Arboviral Handbook for Chikungunya, Dengue, & Zika Viruses. (Consultado 2017 enero 22) <http://www.azdhs.gov/documents/preparedness/epidemiology-disease-control/mosquito-borne/arboviral-handbook.pdf>
- Allan BF, Langerhans RB, Ryberg WA, Landesman WJ, Griffin NW, Katz RS, Chase JM. (2009). Ecological correlates of risk and incidence of West Nile virus in the United States. *Oecologia*, 158(4), 699–708. <http://doi.org/10.1007/s00442-008-1169-9>
- Alonso-Padilla J, Loza-Rubio E, Escribano-Romero E, Córdoba L, Cuevas S, Mejía F, Saiz JC. (2009). The continuous spread of West Nile virus (WNV): seroprevalence in asymptomatic horses. *Epidemiology and Infection*, 137(8), 1163–1168. <http://doi.org/10.1017/S0950268809002325>
- Alves-Costa CP, Da Fonseca GA, Christófaro C. (2004). Variation in the Diet of the Brown-Nosed Coati (*Nasua Nasua*) in Southeastern Brazil. *Journal of Mammalogy*, 85(3), pp.478–482.
- Arana-Guardia R, Baak-Baak CM, Loroño-Pino MA, Machain-Williams C, Beaty BJ, Eisen L, García-Rejón JE. (2014). Stormwater drains and catch basins as sources for production of *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus*. *Acta Tropica*, 134(1), 33–42. <http://doi.org/10.1016/j.actatropica.2014.01.011>

- Armstrong PM, Andreadis TG, Anderson JF. (2015). Emergence of a new lineage of Cache Valley virus (Bunyaviridae: Orthobunyavirus) in the northeastern United States. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 93(1), pp.11–17.
- Austgen LE, Bowen RA, Bunning ML, Davis BS, Mitchell CJ, Chang GJ. (2004). Experimental Infection of Cats and Dogs with West Nile Virus. *Emerging Infectious Diseases*, 10(1), 82–86. <http://doi.org/10.3201/eid1001.020616>
- (AZA) Small Carnivore TAG. (2010). *Procyonid (Procyonidae) Care Manual*. Associations of Zoo and Aquariums. Silver Spring, MD. USA. P. 114.
- Baak-baak CM, Arana-guardia R, Cigarroa-Toledo N, Puc-tinal M, Coba-tún C, Rivero-Osorno V, Lavalle-Kantun D, Loroño-Pino MA, Machain-Williams C, Reyes-Solis et al. (2014). Urban Mosquito Fauna in Mérida City, México: Immatures Collected from Containers and Storm- Water Drains / Catch Basins. *Southwestern Entomologist*, 39(2), 291–306. <http://doi.org/10.3958/059.039.0207>
- Bautista ZF, Delfín GH, Palacio PJ, Delgado CM. (2004). *Técnicas de Muestreo para Manejadores de Recursos naturales*. Primera edición. Universidad Autónoma de México. México D.F. Pp 507.
- Beasley DWC. (2005). Recent Advances in the Molecular Biology of West Nile Virus. *Current Molecular Medicine* 5: 835-850. <http://doi.org/10.3201/eid1012.040647>
- Beasley DWC, Davis CT, Estrada-Franco J, Navarro-Lopez R, Campomanes-Cortes A, Tesh RB, Weaver SC, Barrett ADT. (2004). Genome sequence and attenuating mutations in West Nile virus isolate from Mexico. *Emerging Infectious Diseases*, 10(12), 2221–2224. <http://doi.org/10.3201/eid1012.040647>
- Blackmore CGM. and Grimstad PR. (1998). Cache Valley and Potosi viruses (Bunyaviridae) in white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*): Experimental infections and antibody prevalence in natural populations. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 59(5), pp.704–709.
- Blitvich BJ, Fernandez-Salas I, Contreras-Cordero JF, Marlenee NL, Gonzalez- Rojas JI, Komar N, Gubler DJ, Calisher CH, Beaty BJ. (2003). Serologic evidence of West Nile virus infection in horses, Coahuila State, Mexico. *Emerging Infectious Diseases*, 9(7), 853–856. <http://doi.org/10.3201/eid0907.030166>.

- Blitvich BJ, Fernández-Salas I, Contreras-Cordero JF, Loroño-Pino MA, Marlenee NL, Díaz FJ, González-Rojas JI, Obregón-Martínez N, Chiu-García JA, Black IV WC, Beaty BJ. (2004). Phylogenetic Analysis of West Nile Virus, Nuevo Leon State, Mexico. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 10(7), 1314–1317.
- Blitvich BJ, Juarez LI, Tucker BJ, Rowley WA, Platt KB. (2009). Antibodies to West Nile virus in raccoons and other wild peridomestic mammals in Iowa. *Journal of Wildlife Diseases*, 45(4), 1163–8. <http://doi.org/10.7589/0090-3558-45.4.1163>
- Blitvich B, Saiyasombat R, Travassos da Rosa A, Tesh R, Calisher C, Garcia-Rejon J, Farfán-Ale J, Loroño R, Bates A, Loroño-Pino M. (2012b). Orthobunyaviruses, a common cause of infection of livestock in the Yucatan Peninsula of Mexico. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 87(6), pp.1132–1139.
- Blitvich BJ, Saiyasombat R, Dorman KS, Garcia-Rejon JE, Farfan-Ale JA, Loroño-Pino MA. (2012c). Sequence and phylogenetic data indicate that an orthobunyavirus recently detected in the Yucatan Peninsula of México is a novel reassortant of Potosi and Cache Valley viruses. *Archives of Virology*, 157(6), pp.1199–1204.
- Blitvich B, Saiyasombat R, Talavera-Aguilar L, Garcia-Rejon J, Farfan-Ale J, Machain-Williams C, Loroño-Pino M. (2012a). Orthobunyavirus antibodies in humans, Yucatan Peninsula, México. *Emerging Infectious Diseases*, 18(10), pp.1629–1632.
- Brown HE, Childs JE, Diuk-Wasser MA, Fish D. (2008). Ecological factors associated with West Nile virus transmission, northeastern United States. *Emerging Infectious Diseases*, 14(10), 1539–1545. <http://doi.org/10.3201/eid1410.071396>
- Brugman V A, Hernández-Triana LM, England ME, Medlock JM, Mertens PPC, Logan JG, Carpenter S. (2017). Blood-feeding patterns of native mosquitoes and insights into their potential role as pathogen vectors in the Thames estuary region of the United Kingdom, 1–12. <http://doi.org/10.1186/s13071-017-2098-4>
- Calisher CH. and Sever JL. (1995). Are North American Bunyamwera serogroup viruses etiologic agents of human congenital defects of the central nervous system? *Emerging infectious diseases*, 1(4), pp.147–151.

- Calisher CH. (1994). Medically important arboviruses of the United States and Canada. *Clinical microbiology reviews*, 7(1), pp.89–116.
- Campbell GL, Mataczynski JD, Reisdorf ES, Powell JW, Martin DA, Lambert AJ, Lanciotti RS. (2006). Second human case of Cache Valley virus disease. *Emerging Infectious Diseases*, 12(5), 854–856. <http://doi.org/10.3201/eid1205.051625>
- Casas-Martínez M, Orozco-Bonilla A, Muñoz-Reyes M, Ulloa-García A, Bond JG, Valle-Mora J, Weber M, Rojas JC. (2013). A new tent trap for monitoring the daily activity of (*Aedes aegypti*) and *Aedes albopictus*. *Journal of Vector Ecology*, 38(2), 277–288. <http://doi.org/10.1111/j.1948-7134.2013.12041.x>
- (CDC) Centers for Disease Control and Prevention, Division of Vector Borne Disease (2013). West Nile Virus in the United States: Guidelines for Surveillance, Prevention, and Control, 1–69. (Consultado 2016 enero 10) (<http://www.cdc.gov/westnile/resources/pdfs/wnvGuidelines.pdf>)
- (CDC) Centers for Disease Control and Prevention, Division of Vector Borne Disease (2016). West Nile Virus Disease Cases and Presumptive Viremic Blood Donors by State – United States, 2016 (as of January 17, 2017). (Consultado 2016 diciembre 13) <https://www.cdc.gov/westnile/statsmaps/preliminarymapsdata/histatedate.html>.
- Ceballos G. y Oliva G. (2005). Los mamíferos silvestres de México. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, Fondo de Cultura Económica, México, D. F. p. 986.
- (CDC) Centers for Disease Control and Prevention, Division of Vector Borne (2012). Mosquito species in which West Nile virus has been detected, United States, 1999-2012. (Consultado 2016 diciembre 13) <https://www.cdc.gov/westnile/resources/pdfs/MosquitoSpecies1999-2012.pdf>
- Cigarroa-Toledo N, Blitvich BJ, Cetina-Trejo RC, Talavera-Aguilar LG, Baak-Baak CM, Torres-Chablé OM, Md-Nafiz H, Friedberg I, González-Martinez P, Alonzo-Salomon G. et al. (2016). Chikungunya Virus in Febrile Humans and *Aedes aegypti* Mosquitoes, Yucatan, Mexico. *Emerging Infectious Disease Journal*, 22(10), 10–13. <http://doi.org/10.3201/eid2210.152087>

- Chaves A, Sotomayor-Bonilla J, Monge O, Ramírez A, Galindo F, Sarmiento-Silva RE, Suzán G. (2016). West Nile Virus in Resident Birds from Yucatan, Mexico. *Journal of Wildlife Diseases*, 52(1), 159–163. <http://doi.org/10.7589/2015-02-046>
- Confalonieri UEC. and Costa NC. (2012). Diversity of mosquito vectors (Diptera: Culicidae) in Caxiuan, Par, Brazil. *Interdisciplinary perspectives on Infectious Diseases*, 2012(0 m).
- Conway MJ, Colpitts TM, and Fikrig E. (2014). Role of the Vector in Arbovirus Transmission. *Annual Review of Virology*, 1(1), 71–88. <http://doi.org/10.1146/annurev-virology-031413-085513>
- Cortés-Guzmán AJ, Sánchez-Casas RM, Ibarra-Juárez LA, Ortega-Morales AI, Garcia-Rejón JE, Contreras-Cordero JF, Mis-Ávila P, Fernández-Salas I. (2013). West Nile Virus Survey of Birds, Horses, and Mosquitoes of the Pacific Coast, Southern Mexico. *Southwestern Entomologist*, 38(2), 231–240. <http://doi.org/10.3958/059.038.0208>
- Cove MV, Spínola RM, Jackson VL, Saénz JC. (2014). The role of fragmentation and landscape changes in the ecological release of common nest predators in the Neotropics. *PeerJ*, 2, e464. <http://doi.org/10.7717/peerj.464>
- da Rosa JF, da Rosa AP, Dégallier N, and Vasconcelos PF. (1992). Caracterização e relacionamento antigênico de três novos Bunyavirus no grupo Anopheles A (Bunyaviridae) dos arbovirus. *Revista de Saude Publica*, 26(3), 173–178.
- Darsie RF, Ward RA. (2005). Identification and geographical distribution of the mosquitoes of North America North of Mexico. University of Florida Press. 384pp
- Daszak P, Cunningham AA, Hyatt AD. (2001). Anthropogenic environmental Change and the emergence of infectious diseases in wildlife. *Acta Tropica*, 78, pp.103–116.
- Daszak P, Cunningham AA, Hyatt AD. (2000). Emerging infectious diseases of wildlife: threats to biodiversity and human health. 287(5452), pp.443–449. Available at: <http://eprints.kingston.ac.uk/2526/>.
- Day JF, Shaman J. (2003). Mosquito-borne arboviral surveillance and the prediction of disease outbreaks. *Flavivirus encephalitis*, pp.105–130.

- de Thoisy B, Lacoste V, Germain A, Muñoz-Jordán J, Colón C, Mauffrey JF, Delaval M, Catzeflis F, Kazanji M, Matheus S. et al. (2009). Dengue infection in neotropical forest mammals. *Vector Borne and Zoonotic Diseases* (Larchmont, N.Y.), 9(2), 157–170. <http://doi.org/10.1089/vbz.2007.0280>
- de Thoisy B, Dussart P, Kazanji M. (2004). Wild terrestrial rainforest mammals as potential resevoirs for flaviviruses (yellow fever, dengue 2 and St Louis encephalitis viruses in French Guiana. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 98, 409–412. <http://doi.org/10.1016/j.trstmh.2003.12.003>
- Deardorff E, Estrada-Franco J, Brault AC, Navarro-Lopez R, Campomanes-Cortes A, Paz-Ramirez P, Weaver SC. (2006). Introductions of West Nile virus strains to Mexico. *Emerging Infectious Diseases*, 12(2), 314–318. <http://doi.org/10.3201/eid1202.050871>
- DiMenna MA, Bueno JR, Parmenter RR, Norris DE, Sheyka JM, Molina JL, LaBeau EM, Hatton ES, Roberts C M, Glass GE. (2007). Urban Habitat Evaluation for West Nile Virus Surveillance in Mosquitoes In Albuquerque, New Mexico. *J Am Mosq Control Assoc.* 2007 June; 23(2): 153– 160.
- Denver M. (2003). Chapter 50. Procyonid and Viverridae. *Zoo and Wild Animal Medicine*. Murray E. Fowler and Eric Miller Editors. Fifth Edition. Elsevier Science. USA. Pp 516-523.
- Díaz-Francés E, Soberón-Mainero J. (2005). Statistical Estimation and Model Selection of Species-Accumulation Funtions. *Conserv. Biol.* 19(2): 569-573.
- Díaz-González EE, Kautz TF, Dorantes-Delgado A, Malo-García IR, Laguna-Aguilar M, Langsjoen RM, Chen R, Auguste DI, Sánchez-Casas RM, Danis-Lozano R. et al. (2015). First Report of *Aedes aegypti* Transmission of Chikungunya Virus in the Americas. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene.* 2015; 15.
- Dietrich G, Montenieri JA, Panella NA, Langevin S, Lasater SE, Klenk K, Komar N. (2005). Serologic evidence of West Nile virus infection in free-ranging mammals, Slidell, Louisiana, 2002. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 5(February), 288–292. <http://doi.org/10.1089/vbz.2005.5.288>

- Docherty DE, Samuel MD, Nolden CA, Egstad KF, Griffin KM. (2006). West Nile virus antibody prevalence in wild mammals, Southern Wisconsin. *Emerging Infectious Diseases*, 12(12), 1982–1984. <http://doi.org/10.3201/eid1212.060173>.
- Edwards JF. (1994). Cache Valley virus. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 10(3), 515-524.
- Elliott RM, Schmaljohn CS, Collett MS. (1991). Bunyaviridae genome structure and gene expression. *Curr Top Microbiol Immunol*. 169:91-141.
- Elizondo-Quiroga D, Davis CT, Fernandez-Salas I, Escobar-Lopez R, Velasco OD, Soto-Gastalum LC, Tesh RB. (2005). West Nile virus isolation in human and mosquitoes, Mexico. *Emerging Infectious Diseases*, 11(9), 1449– 1452. <http://doi.org/10.3201/eid1209.050121>
- Estrada-franco JG, Navarro-López R, Beasley DW, Coffey L, Carrara AS, Rosa T, Da Clements T, Wang E, Ludwig GV, Campomanes CA. et al. (2003). West Nile virus in Mexico: Evidence of widespread circulation since July 2002. *Emerging Infectious Diseases* 9(12), 1604–1607.
- Eshoo MW, Whitehouse CA, Zoll ST, Massire C, Pennella TTD, Blyn LB, Wasieloski LP. (2007). Direct broad-range detection of alphaviruses in mosquito extracts. *Virology*, 368(2), 286-295.
- Ezenwa VO, Godsey MS, King RJ, Guptill SC. (2006). Avian Diversity and West Nile virus: testing associations between biodiversity and infectious disease risk. *Proceedings. Biological Sciences / The Royal Society*, 273(1582), 109–117. <http://doi.org/10.1098/rspb.2005.3284>
- Farfán-Ale JA, Blitvich BJ, Marlenee NL, Loroño-Pino MA, Puerto-Manzano F, García-Rejón JE, Rosado-Paredes EP, Flores-Flores LF, Ortega-Salazar A, Chávez-Medina J, Cremieux-Grimaldi JC. et al. (2006). Antibodies to West Nile virus in asymptomatic mammals, birds, and reptiles in the Yucatan Peninsula of Mexico. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 74(5), 908–914. <http://doi.org/74/5/908> [pii]
- Farfan-Ale JA, Loroño-Pino MA, Garcia-Rejon JE, Hovav E, Powers AM, Lin M, Karin S, Dorman KS, Platt KB, Bartholomay LC, Soto V, et al. (2009). Detection of RNA

from a novel West Nile-like virus and high prevalence of an insect-specific flavivirus in mosquitoes in the Yucatan Peninsula of Mexico. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 80(1), 85–95. <http://doi.org/80/1/85> [pii]

Farfan-Ale JA, Loroño-Pino MA, Garcia-Rejon JE, Soto V, Lin M, Staley M, Dorman KS, Bartholomay LC, Hovav E, Blitvich BJ. (2010). Detection of flaviviruses and orthobunyaviruses in mosquitoes in the Yucatan Peninsula of Mexico in 2008. *Vector Borne Zoonotic Dis*, 10(8), 777–83. <http://doi.org/10.1089/vbz.2009.0196>

Fernández-Salas I, Garza-Rodríguez MDL, Beaty BJ, Ramos Jiménez J, Rivas-Estilla AM. (2007). Presencia del virus del oeste del Nilo en el noreste de México. *Salud Publica de Mexico*, 49(3), 210–217. <http://doi.org/10.1590/S0036-36342007000300006>

Ferreira GA, Nakano-Oliveira E, Genaro G, Lacerda-Chaves AK. (2013). Diet of the coati *Nasua nasua* (Carnivora: Procyonidae) in an area of woodland inserted in an urban environment in Brazil. *Revista Chilena de Historia Natural*, 86(1), 95–102. <http://doi.org/10.4067/S0716-078X2013000100008>

Felsenstein J. (1985). Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* 39:783-791.

Fernández-Salas I, Contreras-Cordero JF, Blitvich BJ, González-Rojas JI, Cavazos-Alvarez A, Marlenee NL, Cropp BC. (2003). Serologic Evidence of West Nile Virus Infection in Birds, Tamaulipas State, Mexico. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 3(4), 209–213.

García-García JA, Reding-Bernal A, López-Alvarenga JC. (2013). Cálculo del tamaño de la muestra en investigación en educación médica. *Investigación En Educación Médica*, 2(8), 217–224. [http://doi.org/10.1016/S2007-5057\(13\)72715-7](http://doi.org/10.1016/S2007-5057(13)72715-7)

García HH. (2007). Estudios Entomológicos en Potenciales Vectores de Arbovirus Causantes de Encefalitis. Tesis de Maestría en ciencias. Instituto Politécnico Nacional. Centro de Biotecnología Genómica. Reynosa, Tamaulipas, México. P 87.

García-Rejón JE, Loroño-Pino MA, Farfán-Ale JA, Flores-Flores LF, López-Urbe MP, Najera-Vazquez MDR, Nuñez-Ayala G, Beaty BJ, Eisen L. (2011). Mosquito infestation and dengue virus infection in *Aedes aegypti* females in schools in

- Mérida, México. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 84(3), 489–496. <http://doi.org/10.4269/ajtmh.2011.10-0654>
- Gompper ME. (1996). Sociality and asociality in white-nosed coatis (*Nasua narica*): Foraging costs and benefits. *Behavioral Ecology*, 7(3), pp.254–263. Available at: <http://beheco.oxfordjournals.org/cgi/doi/10.1093/beheco/7.3.254>.
- Gratz NG. (1999). Emerging and Resurging Vector-Borne Diseases. *Annual Review of Entomology*, 44(1), pp.51–75. Available at: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.ento.44.1.51>.
- Greenberg JA, Lujan DA, Di Menna MA, Wearing HJ, Hofkin BV. (2013). Identification of blood meal sources in *Aedes vexans* and *Culex quinquefasciatus* in Bernalillo County, New Mexico. *Journal of Insect Science (Online)*, 13, 75. <http://doi.org/10.1673/031.013.7501>
- Guerbois M, Fernandez-Salas I, Azar SR, Danis-Lozano R, Alpuche-Aranda CM, Leal G, Del Río-Galván SL. (2016). Outbreak of Zika Virus Infection, Chiapas State, México, 2015, and First Confirmed Transmission by *Aedes aegypti* Mosquitoes in the Americas. *J Infect Dis* 2016; 214 (9): 1349-1356. doi: 10.1093/infdis/jiw302
- Githeko A, Lindsay S, Confalonieri U, Patz J. (2000). Climate change and vector-borne diseases: a regional analysis. *Bull World Health Organ*, 78(9), 1136–1147. <http://doi.org/10.1590/S0042-96862000000900009>
- Gu W, Unnasch TR, Katholi CR, Lampman R, Novak RJ. (2008). Fundamental issues in mosquito surveillance for arboviral transmission. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 102(8), 817–822. <http://doi.org/10.1016/j.trstmh.2008.03.019>
- Gu W, Novak RJ. (2004). Short report: Detection probability of arbovirus infection in mosquito populations. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 71(5), pp.636–638.
- Gubler DJ. (1997). Epidemic Dengue / Dengue Haemorrhagic Fever : A Global Public Health Problem in the 21st Century. *Dengue Bulletin*, 21, pp.1–14. Available at: <http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=L37168479>.

- Gubler DJ. (2002). The Global Emergence / Resurgence of Arboviral Diseases As Public Health Problems. *Archives of Medical Research*, 33, pp.330–342.
- Gubler DJ. (2007). The continuing spread of West Nile virus in the western hemisphere. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 45, pp.1039–1046.
- Gubler DJ, Le Duc JW. (1998) Viral zoonoses in: D.C. Dale, D.D. Federman (Eds.) *Scientific American medicine*. Vol. II. Seven infectious diseases. Scientific American, Inc, Seattle, WA, USA; 1998 (1–10.pp).
- Gubler D J, Reiter P, Ebi KL, Patz JA. (2001). Climate variability and change in the United States: potential impacts on vector- and rodent-borne diseases. *Environmental Health Perspectives*, 109 Suppl (May), 223–33. <http://doi.org/10.2307/3435012>
- Guerrero-Sánchez S, Cuevas-Romero S, Nemeth NM, Trujillo-Olivera MTJ, Worwa G, Dupuis A, Estrada-Franco JG. (2011). West Nile virus infection of birds, Mexico. *Emerging Infectious Diseases*, 17(12), 2245–2252. <http://doi.org/http://dx.doi.org/10.3201/eid1712.110294>
- Guimarães FDR, Saddi TM, Cardoso JR, Araújo LB, Araújo EG. (2012). ESTUDO DE PATÓGENOS DE POTENCIAL ZOONÓTICO EM PROCIONÍDEOS. *Revista de Patologia Tropical*, 41(3). <http://doi.org/10.5216/rpt.v41i3.20747>
- Hamer GL, Kitron UD, Goldberg TL, Brawn JD, Loss SR, Ruiz MO, Walker ED. (2009). Host selection by *Culex pipiens* mosquitoes and west nile virus amplification. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 80(2), 268–278. <http://doi.org/80/2/268> [pii]
- Hammer Ř, Harper DAT, Ryan PD. (2001). PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontologia Electronica* 4(1): 9pp
- Hayes EB, Komar N, Nasci RS, Montgomery SP, O'Leary DR, Campbell GL. (2005). Epidemiology and transmission dynamics of West Nile virus disease. *Emerging Infectious Diseases*, 11(8), 1167–1173. <http://doi.org/10.3201/eid1108.050289a>
- Hidalgo-Martínez A, Puerto FI, Farfán-Ale JA, García-Rejón JE, Rosado-Paredes EDP, Méndez-Galván J, Figueroa-Ocampo R, Takashima I, Ramos C. (2008).

- Prevalencia de infección por el virus del Nilo occidental en dos zoológicos del estado de Tabasco. *Salud Publica de Mexico*, 50(1), 76–85. <http://doi.org/10.1590/S0036-36342008000100014>
- Hirsch B. (2009). Seasonal variation in the diet of ring-tailed coatis (*Nasua nasua*) in iguazu, Argentina. *Journal of Mammalogy*, 90(1), pp.136–143.
- Hollidge B S, González-Scarano F, Soldan S S. (2010). Arboviral encephalitides: Transmission, emergence, and pathogenesis. *Journal of Neuroimmune Pharmacology*, 5(3), 428–442. <http://doi.org/10.1007/s11481-010-9234-7>
- Horne KM, Vanlandingham DL. (2014). Bunyavirus-vector interactions. *Viruses*, 6(11), pp.4373–4397.
- Huang C, Slater B, Campbell W, Howard J, White D. (2001). Detection of arboviral RNA directly from mosquito homogenates by reverse-transcription–polymerase chain reaction. *Journal of virological methods*, 94(1), 121-128
- Hubálek Z, Rudolf I, Nowotny N. (2014). Arboviruses pathogenic for domestic and wild animals. *Adv Virus Res.* 2014; 89:201-75.
- (INEGI) Instituto Nacional de Estadística y Geografía. (2010). Información por Entidad: Quintana Roo. (Consultado 2015 marzo 12) (<http://www.cuentame.inegi.org.mx/monografias/informacion/qroo/territorio/clima.aspx?tema=me&e=23>)
- (ICTV) International Committee on Taxonomy of Viruses. (2015). (Consultado 2015 octubre 03) URL: <http://ictvonline.org/virusTaxonomy.asp>.
- (ICTV) International Committee on Taxonomy of Viruses. (2017). Flaviviridae. Genus: Flavivirus. (Consultado 2017 abril 25) URL: https://talk.ictvonline.org/ictvreports/ictv_online_report/positive-sense-rna-viruses/w/flaviviridae/360/genus-flavivirus.
- Jiménez-Valverde A, Hortal J. (2003). Las Curvas De Acumulación De Especies y La Necesidad De Evaluar La Calidad De Los Inventarios Biológicos. *Revista Ibérica de Aracnología*, 8, 151–161. <http://doi.org/1576 - 9518>
- Johnson BJ, Munafo K, Shappell L, Tsipoura N, Robson M, Ehrenfeld J, Sukhdeo MVK. (2012). The roles of mosquito and bird communities on the prevalence of West

- Nile virus in urban wetland and residential habitats. *Urban Ecosystems*, 15(3), 513–531. <http://doi.org/10.1007/s11252-012-0248-1>
- Juliao GR, Abad-Franch F, Lourenco-de-Oliveira R, Luz SLB. (2010). Measuring Mosquito Diversity Patterns in an Amazonian Terra Firme Rain Forest. *Journal of Medical Entomology*, 47(2), 121–128. <http://doi.org/10.1093/jmedent/47.2.121>
- Karabatsos N. (1985). International catalogue of arbovirus, including certain other viruses of vertebrates. *Am Soc Trop Med Hyg.* 84-86.
- Kautz TF, Díaz-González EE, Erasmus J, Malo-García IR, Langsjoen RM, Patterson E, Auguste DI, Forrester N, Sánchez-Casas RM. et al. (2015). Chikungunya virus identified as the ethiological agent of an outbreak of febrile illness in Chiapas, Mexico. *Emerging Infectious Diseases*. 2015; 2(11):2070-2073.
- Kilpatrick AM, Kramer LD, Jones MJ, Marra PP, Daszak P. (2006). West Nile Virus epidemics in North America are driven by shifts in mosquito feeding behavior. *PLoS Biology*, 4(4), 606–610. <http://doi.org/10.1371/journal.pbio.0040082>
- Komar N, Clark GG. (2006). West Nile virus activity in Latin America and the Caribbean. *Pan American Journal of Public Health*, 19(2), 112–7. <http://doi.org/S1020-49892006000200006> [pii]
- Koma, N, Lanciotti R, Bowen R, Langevin S, Bunning M. (2002). Detection of West Nile virus in oral and cloacal swabs collected from bird carcasses. *Emerging Infectious Diseases*, 8(7), 741–742. <http://doi.org/10.3201/eid0807.020157>
- Komar N, Langevin S, Hinten S, Nemeth NM, Edwards E, Hettler DL, Bunning ML. (2003). Experimental Infection of North American Birds with the New York 1999 Strain of West Nile Virus. *Emerging Infectious Disease Journal*, 9 (3), 311. <http://doi.org/10.3201/eid0903.020628>
- Kuno G. (1998). Universal diagnostic RT-PCR protocol for arboviruses. *Journal of virological methods*, 72(1), 27-41.
- Kuno G, Chang GJ. (2005). Biological transmission of arboviruses: Reexamination of and new insights into components, mechanisms, and unique traits as well

as their evolutionary trends. *Clinical Microbiology Reviews*, 18(4), 608–637.

<http://doi.org/10.1128/CMR.18.4.608>

Kuno G, Mitchell CJ, Chang GJ, Smith GC. (1996). Detecting bunyaviruses of the Bunyamwera and California serogroups by a PCR technique. *Journal of Clinical Microbiology*, 34(5), 1184-1188.

Lanciotti RS, Roehrig JT, Deubel V, Smith J, Parker M, Steele K, Crise B, Volpe KE, Crabtree MB, Scherret JH. et al. (1999). Origin of the West Nile virus responsible for an outbreak of encephalitis in the northeastern United States. *Science (New York, N.Y.)*, 286(5448), 2333–7. <http://doi.org/10.1126/science.286.5448.2333>

Langevin SA, Bunning M, Davis B, Komar N. (2001). Experimental infection of chickens as candidate sentinels for West Nile virus. *Emerging Infectious Diseases*, 7(4), 726–729. <http://doi.org/10.3201/eid0704.017422>

Leishnam PT, LaDeau SL, Juliano SA. (2014). Spatial and temporal habitat segregation of mosquitoes in Urban Florida. *PLoS ONE*, 9(3). <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0091655>

Liang G, Gao X, Gould EA. (2015). Factors responsible for the emergence of arboviruses; strategies, challenges and limitations for their control. *Emerging Microbes & Infections*, 4(3), p.e18. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4395659&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

Loroño-Pino MA, Blitvich BJ, Farfán-Ale JA, Puerto FI, Blanco JM, Marlenee NL, Rosado-Paredes EP, García-Rejón JE, Gubler DJ, Calisher CH, Beaty BJ. (2003). Serologic Evidence of West Nile Virus Infection in Horses, Yucatán State, Mexico. *Revista Biomédica*, 14(490), 159–161. <http://links.isiglobalnet2.com/gateway/Gateway.cgi?GWVersion=2&SrcAuth=mekentosj&SrcApp=Papers&DestLinkType=FullRecord&DestApp=WOS&KeyUT=000184022300016>

Loroño-Pino MA, Farfán-Ale JA, Zapata-Peraza AL, Rosado-Paredes EP, Flores-Flores LF, García-Rejón JE, Beaty BJ. (2004). Introduction of the American/Asian genotype of dengue 2 virus into the Yucatan State of Mexico. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 71(4), 485–492. <http://doi.org/71/4/485> [pii]

- Machain-Williams C, Padilla-Paz SE, Weber M, Cetina-Trejo R, Juarez-Ordaz J A, Loroño-Pino MA, Ulloa A, Wang C, Garcia-Rejon JE, Blitvich BJ. (2013). Antibodies to West Nile virus in wild and farmed crocodiles in southeastern Mexico. *Journal of Wildlife Diseases*, 49 (September 2007), 690–3. <http://doi.org/10.7589/2012-11-290>
- Mackenzie JS, Gubler DJ, Petersen LR. 2004. Emerging flaviviruses: the spread and resurgence of Japanese encephalitis, West Nile and dengue viruses. *Nature medicine*, 10(12 Suppl), pp.S98–S109.
- Mann BR, McMullen AR, Swetnam DM, Barrett ADT. (2013). Molecular epidemiology and evolution of West Nile virus in North America. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 10(10), 5111–5129. <http://doi.org/10.3390/ijerph10105111>
- Martin SW, Meek AH, Willeberg P. (1987). *Veterinary epidemiology: principles and methods*. Iowa State University Press, Pp; 40-42.
- McMullen AR, May FJ, Li L, Guzman H, Bueno R, Dennett JA, Tesh B, Barrett ADT. (2011). Evolution of new genotype of west nile virus in North America. *Emerging Infectious Diseases*, 17(5), 785–793. <http://doi.org/10.3201/eid1705.101707>
- Medeiros-Sousa AR, Ceretti-Junior W, de Carvalho GC, Nardi MS, Araujo AB, Vendrami DP, Marrelli MT. (2015). Diversity and abundance of mosquitoes (Diptera:Culicidae) in an urban park: Larval habitats and temporal variation. *Acta Tropica*, 150(August), 200–209. <http://doi.org/10.1016/j.actatropica.2015.08.002>
- Miller DS, Covell DF, McLean RG, Adrian WJ, Niezgoda M, Gustafson JM, Quan TJ. (2000). Serologic survey for selected infectious disease agents in swift and kit foxes from the western United States. *Journal of Wildlife Diseases*, 36(4), 798–805. <http://doi.org/10.7589/0090-3558-36.4.798>
- Monaghan AJ, Morin CW, Steinhoff DF, Wilhelmi O, Hayden MH, Quattrochi DA, Ernst K. (2016). On the seasonal occurrence and abundance of the Zika virus vector mosquito *Aedes Aegypti* in the contiguous United States. *PLoS Current Outbreaks*, 1, 31. <http://doi.org/10.1371/currents.outbreaks.50dfc7f46798675fc63e7d7da563da76.s>

- Moore CG, McLean RG, Mitchell CJ, Nasci RS, Tsai TF, Calisher CH, Marfin AA, Moore PS, Gubler DJ. (1993). Guidelines for arbovirus surveillance programs in the United States. Division of Vector-Borne Infectious Diseases National Center for Infectious Diseases Centers for Disease Control and Prevention Public Health Service. U.S. Department of Health and Human Services Fort Collins, Colorado. Pp 85.
- Morales-Betoulle ME, Komar N, Panella NA, Alvarez D, López RM, Betoulle LJ, Sosa MS, Muller LM, Kilpatrick MA, Lanciotti, SR. et al. (2013). West Nile virus ecology in a tropical ecosystem in Guatemala. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 88(1), pp.116–126.
- Moreno CE. 2001. Métodos para medir la biodiversidad. M&T - Manuales y Tesis SEA, 1, p.84.
- (MTI) Mosquito Taxonomic Inventory, 2015. (Consultado en 2015 octubre 03). <http://mosquito-taxonomic-inventory.info/valid-species-list#>.
- Muñoz M, Navarro JC. (2012). Virus Mayaro: un arbovirus reemergente en Venezuela y Latinoamérica. *Biomédica*, 32(2), pp.286–302.
- Musso D, Gubler DJ. (2016). Zika Virus, 29(3), 487–524. <http://doi.org/10.1128/CMR.00072-15.Address>
- Naranjo JE. (2012). Estimaciones de Abundancia y Densidad de Poblaciones de Fauna Silvestre Tropical. (Consultado 2017 abril 10) [URL:http://www.comfauna.org/wp-content/uploads/2012/PDFsManejofaunasilvestre/Asuncion%201999/1_Herramientas-y-metodos-sobre-el-maneo-de-la-Fauna-Silvestre-en-amazoniaylatinoamerica/3746_enaranjo_EstimacionesAbundanciaDiversidadPoblaciones.pdf](http://www.comfauna.org/wp-content/uploads/2012/PDFsManejofaunasilvestre/Asuncion%201999/1_Herramientas-y-metodos-sobre-el-maneo-de-la-Fauna-Silvestre-en-amazoniaylatinoamerica/3746_enaranjo_EstimacionesAbundanciaDiversidadPoblaciones.pdf)
- Navarrete-Espinosa J, Gómez-Dantés H. (2006). Arbovirus causales de fiebre hemorrágica en pacientes del Instituto Mexicano del Seguro Social. , pp.347–353.
- Neitze DF, Grimstad PR. (1991). Serological evidence of California group and Cache Valley virus infection in Minnesota white-tailed deer. *Journal of Wildlife Diseases*, 27(2), pp.230–237.

- Nemeth N, Gould D, Bowen R, Komar N. (2006). Natural and experimental West Nile virus infection in five raptor species. *J Wildl Dis*, 42(1), 1–13. <http://doi.org/42/1/1> [pii]
- Ngo KA, Maffei JG, Dupuis AP, Kauffman EB, Backenson PB, Kramer LD. (2006). Isolation of Bunyamwera serogroup viruses (Bunyaviridae, Orthobunyavirus) in New York state. *Journal of Medical Entomology*, 43(5), 1004–1009. [http://doi.org/10.1603/0022-2585\(2006\)43\[1004:IOBSVB\]2.0.CO;2](http://doi.org/10.1603/0022-2585(2006)43[1004:IOBSVB]2.0.CO;2)
- Nguyen NL, Zhao G, Hull R, Shelly MA, Wong SJ, Wu G, Menegus MA. (2013). Cache valley virus in a patient diagnosed with aseptic meningitis. *Journal of Clinical Microbiology*, 51(6), 1966–1969. <http://doi.org/10.1128/JCM.00252-13>
- (OIE) Organización Mundial de Sanidad animal. (2015). Enfermedades, infecciones e infestaciones de la Lista de la OIE en vigor en 2015. (Consultado en 2015 septiembre 04) <http://www.oie.int/es/sanidad-animal-en-el-mundo/oie-listed-diseases-2015/>
- (OPS) Organización Panamericana de la Salud. (2015). Alerta Epidemiológica. Infección por virus Zika. 7 de mayo de 2015. P 8. (Consultado 2016 mayo 12). http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=12390&Itemid=42090&lang=es
- (OPS) Organización Panamericana de la Salud (2014, 2015, 2016, 2017). Número de casos reportados de chikungunya en países o territorios de las Américas 2013-2014, 2015, 2016, 2017 (por semanas). (Consultado 2017 febrero 01). http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_topics&view=readall&cid=5932&Itemid=40931&lang=es
- (OPS) Organización Panamericana de la Salud (2017). Número de casos acumulados por virus Zika y síndrome congénito asociado en países o territorios de las Américas, 2015 - 2017 (casos acumulados). (Consultado 2017 febrero 01). http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=12390&Itemid=42090&lang=es
- Ortega-Morales AI, Mis-Ávila P, Elizondo-Quiroga A, Harbach RE, Siller- Rodríguez QK, Fernández-salas I. (2010). Redalyc.THE MOSQUITOES OF QUINTANA ROO

- STATE, MEXICO (DIPTERA: CULICIDAE). *Acta Zoologica Mexicana*, 26(1), 33–46.
- Parra-Henao G, Suárez L. (2012). Mosquitos (Díptera: Culicidae) vectores potenciales de arbovirus en la región de Urabá, noroccidente de Colombia. *Biomédica*, 32, 252–262. <http://doi.org/10.7705/biomedica.v32i2.667>
- Paz S, Semenza JC. (2013). Environmental drivers of West Nile fever epidemiology in Europe and Western Asia—a review. *International journal of environmental research and public health*, 10(8), pp.3543–3562.
- Pozo C, Armijo CN, Calmé S. (editoras). (2011). *Riqueza Biológica de Quintana Roo. Un análisis para su conservación, Tomo I. El Colegio de la Frontera Sur (Ecosur), Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (Conabio), Gobierno del Estado de Quintana Roo y Programa de Pequeñas Donaciones (ppd). México, D. F.*
- Reisen W, Brault AC. (2007). West Nile virus in North America: perspectives on epidemiology and intervention. *Pest management science*, 63(7), pp.641–6. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17373672> [Accessed December 3, 2016].
- Richards SL, Lord CC, Pesko KN, Tabachnick WJ. (2010). Environmental and biological factors influencing *Culex pipiens quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) vector competence for West Nile Virus. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 83(1), 126–34. <http://doi.org/10.4269/ajtmh.2010.09-0776>
- Rivera-ávila RC. (2014). Fiebre chikungunya en México: caso confirmado y apuntes para la respuesta epidemiológica. , 56(4), pp.402–404.
- Roehrig JT, Nash D, Maldin B, Labowitz A, Martin DA, Lanciotti RS, Campbell GL. (2003). Persistence of virus-reactive serum immunoglobulin m antibody in confirmed West Nile virus encephalitis cases. *Emerg Infect Dis*. 9: 376- 379.
- Root JJ, Hall JS, McLean RG, Marlenee NL, Beaty BJ, Gansowski J, Clark L. (2005). Serologic evidence of exposure of wild mammals to flaviviruses in the central and eastern United States. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 72(5), 622–630.
- Saitou N, Nei M. (1987). The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4:406-425.

- Scaramozzino N, Crance JM, Jouan A, DeBriel DA, Stoll F, Garin D. (2001). Comparison of flavivirus universal primer pairs and development of a rapid, highly sensitive heminested reverse transcription-PCR assay for detection of flaviviruses targeted to a conserved region of the NS5 gene sequences. *Journal of Clinical Microbiology*, 39(5), 1922–1927. JOUR.
- Schmaljohn CS, Hooper JW. (2001). Bunyaviridae. En DM Knipe y Fields PM. Eds. Lippincott Williams & Wilkins Howley. Philadelphia. *Virology*, 4th ed, pp. 1581–1602.
- Sexton DJ, Rollin PE, Breitschwerdt EB, Corey GR, Myers SA, Dumais MR, Peters CJ. (1997). Life-threatening Cache Valley virus infection. *New England Journal of Medicine*, 336(8), 547-550.
- (SINAVE) Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica. (2012). Aviso epidemiológico virus del Oeste del Nilo. CoNaVe/05/VIRUS DEL OESTE DEL NILO 20/agosto/2012. (Consultado 2016 octubre 15) (<http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/doctos/alertas/2012/Aviso-VON-200812.pdf>).
- Snapinn KW, Holmes EC, Young DS, Bernard KA, Kramer LD, Ebel GD. (2007). Declining growth rate of West Nile virus in North America. *Journal of Virology*, 81(5), 2531–2534. <http://doi.org/10.1128/JVI.02169-06>
- Soberón J, Llorente J. (1993). The use of species accumulation functions for the prediction of species richness. *Conserv. Biol.*, 7: 480-488
- Sotomayor-Bonilla J, Chaves A, Rico-Chávez O, Rostal MK, Ojeda-Flores R, Salas-Rojas M, Suzán G. (2014). Dengue virus in bats from southeastern Mexico. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 91, 129–31. <http://doi.org/10.4269/ajtmh.13-0524>
- Spiegel J, Bennett S, Hattersley L, Hayden MH, Kittayapong P, Nalim S, Gubler DJ. (2005). Barriers and bridges to prevention and control of dengue: The need for a social-ecological approach. *EcoHealth*, 2(4), 273–290. <http://doi.org/10.1007/s10393-005-8388-x>

- (Ssa) Secretaría de Salud. (2001). Programa de Acción: Enfermedades Transmitidas por Vector. México, DF. (Consultado 2015 febrero 20) (<http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/documentos/vectores.pdf>)
- Swaddle JP, Calos SE. 2008. Increased avian diversity is associated with lower incidence of human West Nile infection: Observation of the dilution effect. *PLoS ONE*, 3(6).
- Takken W, Verhulst NO. (2013). Host Preferences of Blood-Feeding Mosquitoes. *Annual Review of Entomology*, pp.433–453
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S. (2013) MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*. 30 2725-2729.
- Tauro LB, Batallan GP, Rivarola ME, Visintin A, Berrón CI, Sousa EC, Contigiani MS. (2015). Detection of Orthobunyavirus in mosquitoes collected in Argentina. *Medical and Veterinary Entomology*, 29(3), 338–343. <http://doi.org/10.1111/mve.12121>
- (WRBU)The Walter Reed Biosystematics Unit, 2015. (Consultado 2015 septiembre 04) http://www.wrbu.org/northcom_MQ.html
- ThermoScientific, 2011. NanoDrop: Assessment of Nucleic Acid Purity. *Protocols and Product Manuals*, pp.1–2. (Consultado 2017 febrero 07) at: <http://www.nanodrop.com/Library/T042-NanoDrop-Spectrophotometers-Nucleic-Acid-Purity-Ratios.pdf>.
- Thongsripong P, Green A, Kittayapong P, Kapan D, Wilcox B, Bennett S. (2013). Mosquito Vector Diversity across Habitats in Central Thailand Endemic for Dengue and Other Arthropod-Borne Diseases. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 7(10). <http://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002507>
- Turell MJ, O'Guinn ML, Dohm DJ, Jones JW. (2001). Vector Competence of North American Mosquitoes (Diptera: Culicidae) for West Nile Virus. *Journal of Medical Entomology*, 38(2), 130 LP-134. <http://jme.oxfordjournals.org/content/38/2/130.abstract>.
- Ulloa A, Ferguson HH, Méndez-Sánchez JD, Danis-Lozano R, Casas-Martínez M, Bond JG, Rodríguez-Pérez MA. (2009). West Nile Virus Activity in Mosquitoes and

- Domestic Animals in Chiapas, México. Vector-Borne and Zoonotic Diseases, 9(5), 555–560. <http://doi.org/10.1089/vbz.2008.0087>
- Veloso NA, Silva GM. (2001). Chapter 28. Order Carnivora, Family Procyonidae (Raccoons, Kinkajous). Biology, Medicine and Surgery of South American Wild animals. Murray E. Fowler and Zalmir S. Cubas Editors. Iowa State University Press. USA. Pp. 317-322.
- Verdonschot PFM, Besse-Lototskaya AA. (2014). Flight distance of mosquitoes (Culicidae): A metadata analysis to support the management of barrier zones around rewetted and newly constructed wetlands. *Limnologica*, 45(January), 69–79.
- ViralZone. (2017). (Consultado 2017 abril 20) <http://viralzone.expasy.org/>
- Weaver S C. (2006). Evolutionary influences in arboviral disease. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 299, 285–314. http://doi.org/10.1007/3-540-26397-7_10
- Weaver SC, Reisen WK. (2010). Present and future arboviral threats. *Antiviral Research*, 85, 328–345. <http://doi.org/10.1016/j.antiviral.2009.10.008>
- Weaver SC. (2013). Urbanization and geographic expansion of zoonotic arboviral diseases: Mechanisms and potential strategies for prevention. *Trends in Microbiology*, 21(8), pp.360–363. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tim.2013.03.003>.
- Zhou G, Munga S, Minakawa N, Githeko AK, Yan G. (2007). Spatial relationship between adult malaria vector abundance and environmental factors in western Kenya highlands. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 77(1), 29–35. <http://doi.org/77/1/29> [pii]
- Zinser M, Ramberg F, Willott E. (2004). *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) as a potential West Nile virus vector in Tucson, Arizona: blood meal analysis indicates feeding on both humans and birds. *Journal of insect science (Online)*, 4(1), p.20.

8 Anexos

Anexo 1.- Aprobación de protocolo de investigación por el Comité de Ética para la investigación del ECOSUR.



EL COLEGIO DE LA FRONTERA SUR
COMITÉ DE ÉTICA PARA LA INVESTIGACIÓN

San Cristóbal de las Casas, Chiapas, 12 de Febrero de 2016.
CEI-O-006/16.

Ricardo Javier Morales Flores
Estudiante de Maestría
Depto. Conservación de la Biodiversidad
Unidad Campeche
ECOSUR
P R E S E N T E

Posterior a la revisión por parte del Comité de Ética para la Investigación (CEI) de su protocolo de investigación: "Diagnóstico molecular y aislamiento de patógenos del grupo Arbovirus transmitidos por mosquitos hematófagos en poblaciones de Coatíes (Nasua narica) en el Estado de Quintana Roo", con base en el capítulo VI, artículo 20 del Reglamento del CEI de El Colegio de la Frontera Sur, el Comité en pleno dictaminó lo siguiente:

SE APRUEBA

Observaciones:
1. Incluir el permiso mencionado.

Remitir respuesta al CEI

Atentamente

Dr. Benito Salvaterra Izaba
Presidente del CEI



Cp. Everardo Barba Macias (Director de Posgrado)
Cp. Comité de Ética para la investigación
Cp. Tutor de tesis
Cp. Archivo

EL COLEGIO DE LA FRONTERA SUR
San Cristóbal · Tapachula · Chetumal · Villahermosa · Campeche
Carretera Panamericana y Periférico Sur s/n · Barrio de María Auxiliadora · Apdo. Postal 63
C.P. 29290 San Cristóbal de Las Casas, Chiapas-México
Tels.:(01) (967) 674 90 00 Fax (967) 674 90 21
www.ecosur.mx

Anexo 2. Permiso de colecta científica autorizado por la Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT).



SECRETARÍA DE MEDIO AMBIENTE
Y RECURSOS NATURALES

SUBSECRETARÍA DE GESTIÓN
PARA LA PROTECCIÓN AMBIENTAL
DIRECCIÓN GENERAL DE VIDA SILVESTRE

OFICIO NÚM. SGPA/DGVS/ 05526 /16

CIUDAD DE MÉXICO, 03 - JUNIO - 2016

MVZ. RICARDO JAVIER MORALES FLORES
EL COLEGIO DE LA FRONTERA SUR - UNIDAD CAMPECHE
CALLE ANTONIO ENRIQUEZ SAVIGNAC
MZA. 86, LT 1, INT. 15 A
COL. VILLAS MORELOS II
PUERTO MORELOS, BENITO JUÁREZ, QUINTANA ROO
C.P. 77580 - MÉXICO
TEL. 01 (998) 260 8662, E-MAIL: rjmorales@ecosur.edu.mx

Considerando que ha dado cumplimiento a los requisitos establecidos para efectuar investigación y colecta científica de flora y fauna silvestres en territorio mexicano y con fundamento en el Artículo 32 Bis fracciones I, III, XXII, XXXIX de la Ley Orgánica de la Administración Pública Federal, Artículo 19 fracción XXV y 32 fracción VI, XVIII, XXI, XXIV del Reglamento Interior de la Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales, publicado en el Diario Oficial de la Federación el 26 de noviembre de 2012, 79, 80 fracción I, 82, 83 y 87 párrafo cuarto de la Ley General del Equilibrio Ecológico y la Protección al Ambiente, Artículos 9º Fracción XII, 97 y 98 de la Ley General de Vida Silvestre, 12, 123 Fracción IV y 126 del Reglamento de la Ley General de Vida Silvestre, Artículo 85, Artículo 88 fracciones I y II, Artículo 105, fracciones II y III del Reglamento de la Ley General del Equilibrio Ecológico y la Protección al Ambiente en Materia de Áreas Naturales Protegidas (ANP's), las disposiciones relativas de la Norma Oficial Mexicana NOM 126-SEMARNAT-2000, por la que se establecen las especificaciones para la realización de actividades de colecta científica de material biológico de especies de flora y fauna silvestres y otros recursos biológicos en el territorio nacional, la Norma Oficial Mexicana NOM 059 SEMARNAT 2010, protección ambiental especies nativas de México de flora y fauna silvestres-categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio lista de especies en riesgo, la Dirección General de Vida Silvestre **autoriza** la licencia de colecta científica por proyecto sobre especies o poblaciones en riesgo o sobre hábitat crítico, para desarrollar las siguientes actividades inherentes al proyecto de investigación denominado: **"Diagnóstico molecular y aislamiento de patógenos del grupo Arbovirus transmitidos por mosquitos hematófagos en poblaciones de coatis (*Nasua narica*) en el estado de Quintana Roo"**.

- Contención de hasta cien (100) ejemplares por localidad de colecta de la especie "tejón de Cozumel" *Nasua narica* para la toma de datos morfológicos (peso), sexado, evaluación de la etapa de desarrollo, obtención de muestras de tejidos (sanguíneas, dérmicas, pelo, exudados nasales y excretas), marcaje auricular mediante colocación de marca plástica o por medio de muesca en el pabellón auricular y su liberación inmediata
- Colecta de mosquitos hematófagos para su identificación taxonómica en el laboratorio de Arbovirología del Centro de Investigaciones Regionales "Dr. Hideyo Noguchi" de la Universidad Autónoma de Yucatán (UADY).

Las actividades de colecta se llevarán a cabo en las siguientes localidades: **1) Hotel Moon Palace, 2) Hotel Bahía Principe, 3) parque turístico Xoximilco, Xcaret y 4) parque turístico Xel-Ha, estado Quintana Roo.** La presente autorización tendrá una vigencia de un (01) año a partir de la emisión de la misma.

Las actividades se realizarán con el Aval de El Colegio de la Frontera Sur - Unidad Campeche, con la colaboración del Dr. Manuel Weber Rodríguez, **debiendo sujetarse obligatoriamente el titular y el colaborador a las siguientes condiciones.**

Continúa al reverso /
Hoja 1 de 2

Anexo 3. Hoja de Campo para la colecta de datos de los sitios de estudio y coatíes.

Registros de captura y condición de salud en mamíferos terrestres

Captura # (CLAVE)

I. Datos generales de captura:

Localidad _____ Transecto _____ Hora _____ Trampa _____ Fecha: _____
 T. _____
 Vegetación _____ ambiental _____ Nubosidad _____ Viento _____

II. Datos y medidas corporales de la especie:

Genero/Especie _____ Nombre común _____
 Sexo _____ Peso _____ Edad _____ Marca _____
 Longitud total _____ Longitud del cráneo _____ Longitud de la pata trasera _____

III. Dosis y drogas suministradas

Tiempo	Dosis	Droga usada	Método admin.	Inducción	Recuperación
_____	_____	_____	_____	_____	_____
_____	_____	_____	_____	_____	_____
_____	_____	_____	_____	_____	_____

Temperatura corporal	Frecuencia cardiaca	Frecuencia respiratoria	Saturación de oxígeno
_____	_____	_____	_____
_____	_____	_____	_____
_____	_____	_____	_____

V. Comportamiento y condiciones de salud

Estado de salud	Conducta general:	Condición corporal
[] Normal	[] Calmo	[] Normal
[] Anormal	[] Activo	[] Delgada
	[] Agresivo	[] Caquético

VI. Muestras biológicas tomadas

Tipo	# de muestra (etiqueta)	Cantidad	Método de preservación
Sangre completa	_____	_____	_____
Suero	_____	_____	_____
Plasma	_____	_____	_____
Heces (copro)	_____	_____	_____
Saliva	_____	_____	_____
Cornetes nasales	_____	_____	_____
Ectoparásitos	_____	_____	_____

Comentarios y notas

Anexo 4. Abundancia de mosquitos hematófagos colectados por método de aspirado en el Sitio A, durante las épocas de secas y lluvias. Mostrando estación, especies, estado de alimentación, sexo y abundancia total.

Estación	Especie ^A	A1	A2	A3-4	A5	Grávidas	Hembras	Machos	Total
Secas	<i>Aedes aegypti</i>	2	0	1	2	2	7	6	13
	<i>Anopheles albimanus</i>	0	0	0	0	0	0	1	1
	<i>Culex quinquefasciatus</i>	94	2	0	1	7	104	297	401
	<i>Ochlerotatus taeniorhynchus</i>	193	2	4	1	6	206	5	211
	Total	289				28^B	317^C (50.56%)	310 (49.44%)	627^D (100%)
Lluvias	<i>Aedes aegypti</i>	2	0	0	0	0	2	0	2
	<i>Culex interrogator</i>	9	1	0	0	0	10	0	10
	<i>Culex quinquefasciatus</i>	11	2	0	2	1	16	17	33
	<i>Ochlerotatus taeniorhynchus</i>	108	0	1	0	0	109	2366	2475
	<i>Psorophora ferox</i>	87	0	0	1	3	91	42	133
	Total	217				11^B	228^C (8.60%)	2425 (91.40%)	2653^D (100%)

A1= Hembras no alimentadas; A2= Hembras recién alimentadas; A3-4 y A5= Hembras alimentadas; A: $U=53.5$, $Z= -1.157$, $p= 0.247$; B: $t=1.653$, $df= 10$, $p= 0.129$; C: $t= 0.945$, $df=10$, $p=0.367$; D: $U=16$, $Z= -0.320$, $p= 0.749$.

Anexo 5. Abundancia de mosquitos hematófagos colectados por método de aspirado en el Sitio B, durante las épocas de secas y lluvias. Mostrando estación, especies, estado de alimentación, sexo y abundancia total.

Estación	Especie ^A	A1	A2	A3-4	A5	Grávidas	Hembras	Machos	Total
Secas	<i>Aedes aegypti</i>	29	33	39	13	9	123	78	201
	<i>Culex nigripalpus</i>	1	0	0	0	0	1	0	1
	<i>Culex quinquefasciatus</i>	144	11	5	6	77	243	211	454
	<i>Mansonia titillans</i>	6	0	0	0	0	6	0	6
	<i>Ochlerotatus taeniorhynchus</i>	3	1	0	2	0	6	0	6
	Total	183				196^B	379^C (56.70%)	289 (43.70%)	668^D (100%)
Lluvias	<i>Aedes aegypti</i>	26	21	15	7	0	69	63	132
	<i>Anopheles albinamus</i>	1	0	0	0	0	1	0	1
	<i>Culex nigripalpus</i>	5	4	2	1	17	29	152	181
	<i>Culex quinquefasciatus</i>	165	21	5	11	58	260	625	885
	<i>Mansonia titillans</i>	0	2	0	0	0	2	0	2
	<i>Ochlerotatus taeniorhynchus</i>	5	3	0	0	0	8	0	8
	Total	202				167^B	369^C (30.50%)	840 (69.50)	1209^D (100%)

A1= Hembras no alimentadas; **A2=** Hembras recién alimentadas; **A3-4 y A5=** Hembras alimentadas; **A:** $U=45.00$, $Z= -1.623$, $p= 0.105$; **B:** $t=0.574$, $df= 10$, $p= 0.579$; **C:** $t= t=0.088$, $df=10$, $p= 0.932$; **D:** $U=5.00$, $Z= -2.082$, $p= 0.037$

Anexo 6. Abundancia de mosquitos hematófagos colectados por método de trampa Magoon en el sitio A, durante las épocas de secas y lluvias. Mostrando estación, especies, estado de alimentación, sexo y abundancia total.

Estación	Especie ^A	A1	A2	A3-4	A5	Grávidas	Hembras	Machos	Total
Secas	<i>Aedes aegypti</i>	0	0	0	0	0	0	2	2
	<i>Ochlerotatus taeniorhynchus</i>	9	3	1	0	4	17	3	20
	<i>Culex quinquefasciatus</i>	7	4	0	2	0	13	4	17
	Total	16	7^B		7		30^C (76.92%)	9 (23.08%)	39 (100%)
Lluvias	<i>Aedes aegypti</i>	0	1	0	0	0	1	0	1
	<i>Anopheles albimanus</i>	0	1	0	0	0	1	0	1
	<i>Culex quinquefasciatus</i>	4	9	2	2	5	22	1	23
	<i>Mansonia titillans</i>	0	1	0	0	0	1	0	1
	<i>Ochlerotatus taeniorhynchus</i>	11	3	0	1	3	18	1	19
	<i>Psorophora ferox</i>	4	0	1	0	0	5	0	5
Total	19	15^B		14		48^C (96%)	2 (4%)	50 (100%)	

A1= Hembras no alimentadas; **A2=** Hembras recién alimentadas; **A3-4 y A5=** Hembras alimentadas; **A:** $U=9.00$, $Z= -1.506$, $p= 0.132$; **B:** $U=10.50$, $Z= -1.260$, $p= 0.208$; **C:** $U=08.00$, $Z= -1.615$, $p= 0.106$.

Anexo 7. Abundancia de mosquitos hematófagos colectados por método de trampa Magoon en el sitio B, durante las épocas de secas y lluvias. Mostrando estación, especies, estado de alimentación, sexo y abundancia total.

Estación	Especie ^A	A1	A2	A3-4	A5	Grávidas	Hembras	Machos	Total
Secas	<i>Aedes aegypti</i>	1	0	0	0	0	1	1	2
	<i>Culex quinquefasciatus</i>	10	1	0	0	67	78	24	102
	<i>Haemagogus equinus</i>	1	2	0	0	0	3	0	3
	<i>Mansonia titillans</i>	2	0	0	0	0	2	0	2
	<i>Ochlerotatus taeniorhynchus</i>	12	0	0	3	3	18	2	20
	Total		26	3^B		73		102^C (79.09%)	27 (20.93%)
Lluvias	<i>Aedes fulvus pallens</i>	4	0	0	0	0	4	0	4
	<i>Culex nigripalpus</i>	1	0	0	0	13	14	1	15
	<i>Culex quinquefasciatus</i>	26	7	5	4	19	61	66	127
	<i>Mansonia titillans</i>	5	2	0	0	0	7	2	9
	<i>Ochlerotatus taeniorhynchus</i>	43	7	0	0	0	50	0	50
	Total		79	16^B		41		136^C (66.34%)	69 (33.66%)

A1= Hembras no alimentadas; **A2=** Hembras recién alimentadas; **A3-4 y A5=** Hembras alimentadas; **A:** $t=-1.274$, $df= 10$, $p= 0.231$; **B:** $U=04.50$, $Z= -2.242$, $p= 0.025$; **C:** $t=0.467$, $df= 10$, $p= 0.650$

Anexo 8. Coatíes Capturados y muestreados en el sitio A en época de secas y lluvias; clasificados por sexo y etapa de vida, mostrando promedios y desviación de peso y largo total.

Etapa	Hembras	%	Peso (kg.)	LT (cm.)	Machos	%	Peso (kg.)	LT (cm.)	Total
Cría	12	44	1.07 ± 0.08	59.90 ± 2.18	15	56	1.11 ± 0.13	60.98 ± 3.67	27
Jovenil	13	45	2.22 ± 0.54	87.46 ± 8.49	16	55	2.46 ± 0.74	90.72 ± 11.74	29
Adulto	17	71	4.38 ± 0.36	102.87 ± 6.25	7	29	4.53 ± 1.05	108.11 ± 4.50	24
Total	42	52.5			38	47.50			80

Peso expresado en kilogramos; LT= Largo Total expresado en centímetros.

Anexo 9. Coatíes Capturados y muestreados en el sitio B en época de secas y lluvias; clasificados por sexo y etapa de vida, mostrando promedios y desviación de peso y largo total.

Etapa	Hembras	%	Peso (kg.)	LT (cm.)	Machos	%	Peso (kg.)	LT (cm.)	Total
Cría	4	29	0.625 ± 0.17	55.05 ± 3.54	10	71	0.80 ± 0.32	56.12 ± 11.51	14
Juvenil	10	59	2.60 ± 0.71	89.80 ± 6.33	7	41	2.61 ± 0.24	92.39 ± 3.90	17
Adulto	19	39	3.27 ± 0.57	97.23 ± 4.76	30	61	4.54 ± 0.48	105.99 ± 5.68	49
Total	33	41.25			47	58.75			80

Peso expresado en kilogramos; LT= Largo Total expresado en centímetros.

Anexo 10. Secuencias genéticas obtenidas de las muestras de coatí.

Muestra de Coatí (DM_MEX.QROO01): (5'-TGCCAGGAAAATTTGTATTAATACAGTAACCTTCAGCCCCCAAGGTTAAGCGTAACCTCCCATTCACTTCTTTTTGTGAGACTAGTTTTAATCTCGCGTCCTTTAATGTAGAAGATTCGAATGTGGTCATAACTAAGCCCAGTGGTGTAGATACGCTTAAAGTTAACGTATGCAATCTCTGGGTCAAAGTACTGCTGGTGTAGCACCACATCATGAACTCCAACCTCAGTCAT-3') 237 pares de bases, correspondiente a virus Bunyawera, serotipo Cache Valley.

Muestra de Coatí (CM_MEX.QROO02): (5'-AATACAGTAACCTTCCAGCCCCCAAGGTTAAGCGTAACCTCCCATTCACTTCTTTTTGTGAGACTAGTTTTACTCTCGCGTCCTTTAATGTAGAAGATTCGAATGTGGTCATAACTAAGCCCAGTGGTGTAGATACGCTTAAAGTTAACGTATGCAATCTCTGGGTCAAAGTACTGCTGGTGTACACGACATCATGAACTCCAACCTCAGTCAT-3') 215 pares de bases, correspondiente a virus Bunyawera, serotipo Cholul virus.

Muestra control positivo (ECBUNYAMEXYUCHNLA): (5'-TGTTCTGTTGCCAGGAAAATTAGTATTAATACAGTAACCTTCCAGCCCCCAAGGTTAAGCGTAACCTCCCATTCACTTCTTTTTGTGAGACTAGTTTTAATCTCGCGTCCTTTAATGTAGAAGATTCGAATGTGGTCATAACTAAGCCCAGTGGGTGTAGATACGCTTAAAGTTAACGTATGCAATCTCTGGGTCAAAGTACTGCTGGTGTAGCAGCGACATCATGAACTCCAACCTCAGTCAT-3'), 248 pares de bases,

Muestra de Coatí (AM_MEX.QROO01): (5'-AAGGAAGCAGAGCCATCTGGTTCATGTGGCTCGGAGCTCGCTTTCTGGAGTTCGAGGCTCTGGGTTTTCTCAATGAAGACCACTGGCTCGGAAGAAAGAACTCA-3'), 105 pares de bases, correspondiente a VON.

Muestra control positivo (DENV1MEXYUCHNLA): (5'-AAAGGAAGCCGTGCAATATGGTACATGTGGCTGGGAGCACGCTTTCTGGAGTTCAAGCCCTTGGTTTCATGAATGAAGATCACTGGTTTAGCAGAGAGAATTCCTCAGTGATTGAAGGAGAAGGACTGCACAACTTGGATACATA-3'), 148 pares de bases, correspondiente a virus Dengue, serotipo 1.

Anexo 11. Artículo enviado a la revista ECOHEALTH.

De: **EcoHealth** onbehalfof+journal+ecohealth.net@manuscriptcentral.com
Asunto: EcoHealth - Manuscript ID ECH-17-0071
Fecha: 30 de marzo de 2017, 11:59
Para: mweber@ecosur.mx

E

30-Mar-2017

Dear Dr. Weber:

Your manuscript entitled "Molecular detection of West Nile Virus in white-nosed coatis in southeastern Mexico" has been successfully submitted online and is presently being given full consideration for publication in EcoHealth.

Your manuscript ID is ECH-17-0071.

Please mention the above manuscript ID in all future correspondence. If there are any changes in your street address or e-mail address, please log in to Manuscript Central at <https://mc.manuscriptcentral.com/ecohealth> and edit your user information as appropriate.

You can also view the status of your manuscript at any time by checking your Author Center after logging in to <https://mc.manuscriptcentral.com/ecohealth>.

Thank you for submitting your manuscript to EcoHealth.

Sincerely,

Aleksei Chmura
Managing Editor, EcoHealth
www.ecohealth.net

Molecular detection of flavivirus, West Nile Virus-like in white-nosed coatis in southeastern Mexico.

Ricardo Morales-Flores¹, Carlos Machain-Williams², Lourdes Talavera-Aguilar², Nohemí Cigarroa-Toledo², Carlos Baak-Baak², Aarón Yeh-Gorocica², Manuel-Weber^{1*}

Author affiliations:

¹ Departamento de Conservación de la Biodiversidad. El Colegio de la Frontera Sur, Campeche México. Avenida Rancho Polígono 2^a Ciudad Industrial Lerma, Campeche, Mexico 24500

² Laboratory of Arbovirology, Hideyo Noguchi Research Center, Universidad Autónoma de Yucatán, Calle 43 No. 613 x Calle 90 Colonia Inalámbrica CP, 97069 Mérida, Yucatán, México

Running Head: West Nile Virus in Coatis (*Nasua narica*) Mexico.

Key Words: Flavivirus, West Nile Virus, Coatis, *Nasua narica*; RT-PCR, México; *Culex quinquefasciatus*,

Word Count: 1499 words

***Corresponding Author:**

Full Name: Manuel Weber

Full Affiliation: Departamento de Conservación de la Biodiversidad. El Colegio de la Frontera Sur-ECOSUR

Full Address & Country: Departamento de Conservación de la Biodiversidad. El Colegio de la Frontera Sur, Campeche México. Avenida Rancho Polígono 2^a Ciudad Industrial Lerma, Campeche, Mexico 24500

(telephone) +52 (981) 1273720 ext. 2300

(fax) +52 (981) 1273720 ext. 2300

(address) <http://www.ecosur.mx/academico/mweber/>

Acknowledgments:

We would like to thank the unconditional support received from the Arbovirology laboratory at the Hideyo Noguchi Research Center for the facilities granted in equipment, reagents and technical support. Field work was partially supported by CONACYT master's thesis scholarship to the first author and the Departamento de Conservación de la Biodiversidad, El Colegio de la Frontera Sur, Campeche México. We would like to thank MSc Paulina Aguilar Martínez, veterinarians José Pablo Trejo, Víctor Alba, Ricardo Morales Nuñez, Oswaldo Torres Chablé,

José Alonso May Uicab and Ana Lilia Bolio Sosa for assistance during field work. To Wilberth Chi Chim and Biologist Rosa Cetina Trejo and Julio Tzuc Dzul for entomological advice.

Molecular detection of flavivirus, West Nile Virus-like in white-nosed coatis in southeastern Mexico.

Abstract.

Several emerging infectious diseases caused by arboviruses have increased their incidence or expanded their geographic range, affecting new host populations associated with environmental and anthropogenic modifications. We conducted surveillance for flavivirus infections in wild populations of coatis (*Nasua narica*) and several mosquito species in Quintana Roo, Mexico during April-May and July-August 2016. Three (n=3/160) coati serum samples were RT-PCR positive for Flaviviridae family but all mosquitoes were negative. Genetic sequencing analyses showed a 99% RNA identity corresponding to West Nile Virus (WNV). To the best of our knowledge, this is the first report of a flavivirus WNV-like in wild coatis.

Keywords: Flavivirus, West Nile Virus, Coatis, *Nasua narica*, RT-PCR, México

Molecular detection of flavivirus, West Nile Virus-like in white-nosed coatis in southeastern Mexico.

Since the epidemic encephalitis of West Nile Virus (WNV, family Flaviviridae, genus: Flavivirus) occurred in New York city, USA in 1999 (Lanciotti et al., 1999) it has dispersed throughout the American continent (Komar and Clark 2006). In México have been reported in domestic and wild birds, horses, zoo animals and humans (Fernández-Salas et al., 2003; Beasley et al., 2004; Hidalgo-Martínez et al., 2008; Farfán-Ale et al., 2006; Machain-Williams et al., 2013; Ulloa et al., 2009; Cortés-Guzmán et al., 2013; Chaves et al., 2016). In Yucatán peninsula, several vertebrates such as birds and mammals have been seropositive for WNV by Plaque Reduction Neutralization Test (Farfán-Ale et al., 2006).

White-nosed coatis (*Nasua narica*) are medium-sized mammals that can be highly synanthropic with abundant populations in disturbed areas in the Neotropics (Cove et al., 2014). Despite its proximity to humans, studies carried out for arboviruses surveillance in this species are scarce. Coatis can be very abundant in areas near touristic development poles, promoting an intense interaction between potential reservoirs and humans. Mosquitoes can also be very abundant in recreational places of the tropics, promoting the risk of transmission of arboviruses between coatis and susceptible visitors. The goals of this study were two-fold: 1). - To determine if wild populations of coatis and mosquitoes-based virus surveillance present viral genome of the family Flaviviridae and their prevalence and 2). - To know the species of mosquitoes associated with coatis in two major recreational tourist developments in Quintana Roo State, Mexico.

The work was carried out in the sites IPP and XH located in the municipalities of Solidaridad and Tulum, Quintana Roo, México. Procedures were approved by the Ethics Committee from El Colegio de la Frontera Sur (CEI-O-006/16) and permits by the Mexican Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SGPA/DGVS/05526/16).

Coatis were caught in troops using home-made wire box traps (1.5 x 1.5 x 0.6 m) and were anesthetized with ketamine (10 mg/kg) injected intramuscularly (Denver 2003); blood samples, body measurement, weight, sex and age group were taken and general health status was assessed (AZA 2010). Samples were carried out in dry (April-May 2016) and rainy (July-August 2016) season, twice a day for 3 consecutive days. Mosquitoes surveillance was conducted using CDC backpack-mounted aspirators. Mosquitoes associated with coatis were collected with Magoon traps (Ulloa et al., 2009), using an adult male coati as life bait. Males were discarded and females

were classified by species and feeding status (A1: Unfed; A2: freshly fed mosquitoes, blood fed in the process of digestion and gravid); blood samples and mosquitoes were maintained in liquid nitrogen (Farfan-Ale et al. 2010).

We compared the abundance of females and A2 between sites and season, using a student T test for independent samples or a Mann-Whitney U test ($p < 0.05$). A post-hoc statistical power calculation was conducted to estimate the retrospective sample size for coatis using G*Power software version 3.1.9.2.

Specimens were pooled into groups of 35 mosquitoes and 10 coati serum samples and RNA was extracted with the Trizol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. Complementary DNA was generated using ImProm-II Reverse kit (Promega, WI, USA) and PCRs were performed using *Taq* Polymerase kit (Invitrogen) and analyzed by RT-PCR using generic primers for family *Flaviviridae* (MAMD, CFD2 and FS778) 250-nt NS5 region of the non-structural protein (Scaramozzino et al., 2001). RT-PCR products were purified by using Wizard Purification Systems kit (Promega) and sequenced in the Institute of Biotechnology of the National Autonomous University of Mexico.

Genetic sequences were performed using BLAST of the NCBI and the ClustalW program in GenBank and later phylogenetic analysis within the tools of the MEGA Version 6 program (Tamura et al., 2013). Phylogenetic analysis was performed using the Neighbor-Joining Evolutionary Inference method (Saitou and Nei 1987) with bootstrapping 1000 times (Felsenstein 1985).

160 coatis were caught and sampled (80 specimens in each site). A total of 1906 female mosquitoes were collected and *Culex quinquefasciatus*, *Aedes taeniorhynchus* and *Aedes aegypti* were the most frequent. In mosquito surveillance 1293 female mosquitoes were collected from 8 species and 5 genera, the abundance of female mosquitoes between IPP (n=545) and XH (n=748) showed no significant statistical difference ($t = -1.418$, $df = 22$, $p = 0.170$); the abundance of A2 was higher in XH (n=363, 48%) than IPP (n=39, 7%; $t = -6.45$, $df = 22$, $p = 0.000$) [insert Tables 1 and 2 here]. Using Magoon tramps, 316 female mosquitoes were found associated with coatis, belonging to 9 species and 6 genera [insert Tables 3 and 4 here]. the abundance of female mosquitoes was higher in XH (n=238) than IPP (n=78, $U = 37.50$, $Z = -1.996$, $p = 0.046$); the abundance of A2 between XH (n= 133; 56%) and IPP (n=43; 55%) showed no significant

statistical difference ($t = -1.931$, $df = 22$, $p = 0.067$) [insert Tables 3 and 4 here]. There were no statistically significant differences in both collection methods in relation with seasonality.

All mosquito samples were negative by RT-PCR and two pools of coatis' samples were positive [insert Figure 1 here]. Therefore, the general prevalence of viral RNA for the family Flaviviridae in coatis was 1.87% ($n = 3/160$); in XH 1.25% ($n = 1/80$ wet season) and 2.5% in IPP ($n = 2/80$ dry season). A sequence called AM_MEX.QROO01

(5'AAGGGAAGCAGAGCCATCTGGTTCATGTGGCTCGGAGCTCGCTTTCTGGAGTTCGAGGCTCTGGGTTTTCTCAATGAAGACCACTGGCTCGGAAGAAAGAACTCA-3'),

estimated length of 105-nt (GenBank accession number not generated as a sequencing product less than 200-nt) belong to a fragment coding for the NS5 region, analysis showed that nucleotide sequence had 99% identity for WNV; AM_MEX.QROO01 was grouped in 57% of replicates of the bootstrap test [insert Figure 2 here].

According to the post-hoc statistical power analysis, the power reached with a sample of 160 coatis was 0.93 (1-beta) with 95% confidence level; the statistical power reached was higher than the accepted minimum threshold (80%) in biomedical research (García-García et al., 2013).

Moreover, oral infection of WNV in coatis could be possibly associated with changes in feeding habits in highly urbanized areas (Cove et al., 2014), where the diet of coatis diversifies including small vertebrates, eggs of different species and birds (Alves-Costa et al., 2004; Ferreira et al., 2013). It has been demonstrated that wild and domestic birds have the capacity to eliminate oral and cloacal WNV being an alternative route of infection (Langevin et al., 2001; Komar et al., 2002; Guerrero-Sánchez et al., 2011). Experimental studies suggest that dogs and cats are easily infected by WNV from mosquito bites and oral exposure; the high oral transmission efficiency observed suggests that infected prey can serve as an important source of infection in carnivores (Austgen et al., 2004).

The probability of detection of arboviruses in mosquito populations is usually very low or absent in most vector control surveillance samplings (Gu and Novak 2004). In Mexico, WNV has been isolated at low prevalence in *Culex nigripalpus* (Ulloa et al., 2009), *Culex interrogator* (Cortés-Guzmán et al., 2013) and *Culex quinquefasciatus* (Hidalgo-Martínez et al., 2008). In the Yucatan Peninsula of México, WNV has not been reported in mosquitoes using RT-PCR or viral isolation (Farfan-Ale et al., 2009; Farfan-Ale et al. 2010). According to the sample size of mosquitoes

analyzed, the probability of detection of arbovirus in mosquitoes was higher (0.8) with a 1 per 1000 infection rate with 95% confidence intervals (Gu and Novak 2004).

Some factors that could help explain why no WNV-positive mosquitoes were found by RT-PCR: A low proportion of A2 females were collected in IPP and XH, for a successful arbovirus transmission in the vectors, they must have available host amplifiers for feeding (Mackenzie et al. 2004), besides, chemical vector control and use of repellents by some guests and workers is a frequent practice in these tourist development centers, which decrease mosquitoes populations and their feeding success (Weaver 2013).

In addition, one of the 3 most abundant species (*Aedes taeniorhynchus*) is a short-lived species that seldom serves as an efficient arbovirus vector (Day and Shaman 2003). Species of *Culex sp.* mosquitoes may change their feeding pattern & preferences to mammals and other lesser-resorted bird species (Zinser et al., 2004) when bird diversity is altered by anthropic or environmental factors or influenced by local or seasonal conditions (Greenberg et al., 2013). The loss of diversity tends to increase the risk of transmission of arboviruses and other pathogens (Ezenwa et al., 2006, Swaddle and Calos 2008, Thongsripong et al., 2013) but further studies should be conducted at study sites to demonstrate these factors and patterns. Furthermore, mosquito vectorial capacity, extrinsic incubation temperatures and other environmental factors may have influenced our mosquito sampling results (Richards et al., 2010).

In conclusion, this work provides useful insight on the prevalence of infection to estimate sample sizes for retrospective studies with coatis in southern México and elsewhere in the Neotropics and to better-understand their role in the ecology of this emergent arbovirus disease. To the best of our knowledge, this is the first report of a flavivirus WNV-like in wild coatis in Mexico. Since this species is highly synanthropic in the region, their role as competent hosts and possibly in the transmission of arboviruses to human populations in a tourism development pole, should not go unnoticed.

References

- Alves-Costa CP, Da Fonseca GB, Christófaro C (2004) Variation in the Diet of the Brown-Nosed Coati (*Nasua Nasua*) in Southeastern Brazil. *Journal of Mammalogy*, 85(3), pp.478–482.
- Austgen LE, Bowen RA, Bunning ML, Davis BS, Mitchell CJ, Chang GJ (2004) Experimental Infection of Cats and Dogs with West Nile Virus. *Emerging Infectious Diseases*, 10(1), 82–86. <http://doi.org/10.3201/eid1001.020616> [Online January 08, 2017].
- AZA (2010) Small Carnivore TAG. Procyonid (Procyonidae) Care Manual. Associations of Zoo and Aquariums. Silver Spring, MD. USA. P. 114. Available: <https://www.aza.org/assets/2332/procyonidcaremanual2010r.pdf> [accessed Feb 07, 2015].
- Beasley DWC, Davis CT, Estrada-Franco J, Navarro-Lopez R, Campomanes-Cortes A, Tesh RB, Weaver SC, Barrett ADT (2004) Genome sequence and attenuating mutations in West Nile virus isolate from Mexico. *Emerging Infectious Diseases*, 10(12), 2221–2224. <http://doi.org/10.3201/eid1012.040647> [Online November 03, 2016].
- Chaves A, Sotomayor-Bonilla J, Monge O, Ramírez A, Galindo F, Sarmiento-Silva RE, Suzán G (2016) West Nile Virus in Resident Birds from Yucatan, México. *Journal of Wildlife Diseases*, 52(1), 159–163. <http://doi.org/10.7589/2015-02-046> [Online November 05, 2016].
- Cortés-Guzmán AJ, Sánchez-Casas RM, Ibarra-Juárez LA, Ortega-Morales AI, Garcia- Rejón JE, Contreras-Cordero JF, Mis-Ávila P, Fernández-Salas I (2013) West Nile Virus Survey of Birds, Horses, and Mosquitoes of the Pacific Coast, Southern Mexico. *Southwestern Entomologist*, 38(2), 231–240. <http://doi.org/10.3958/059.038.0208> [Online April 20, 2016].
- Cove MV, Spínola RM, Jackson VL, Saénz JC (2014) The role of fragmentation and landscape changes in the ecological release of common nest predators in the Neotropics. *PeerJ*, 2:e464. <http://doi.org/10.7717/peerj.464> [Online April 25, 2016].
- Day JF, Shaman J (2003) Mosquito-borne arboviral surveillance and the prediction of disease outbreaks. *Flavivirus encephalitis*, pp.105–130. <http://doi.org/DOI:10.5772/24068> [Online November 07, 2016].
- Denver M (2003) Chapter 50. Procyonid and Viverridae. *Zoo and Wild Animal Medicine*. Murray E. Fowler and Eric Miller Editors. Fifth Edition. Elsevier Science. USA. Pp. 516–523.
- Ezenwa VO, Godsey MS, King RJ, Guptill SC (2006) Avian diversity and West Nile virus: testing associations between biodiversity and infectious disease risk. *Proceedings. Biological Sciences / The Royal Society*, 273(1582), 109–117. <http://doi.org/10.1098/rspb.2005.3284> [Online January 14, 2016].
- Farfán-Ale JA, Blitvich BJ, Marlenee NL, Loroño-Pino MA, Puerto-Manzano F, García-Rejón JE, Rosado-Paredes EP, Flores-Flores LF, Ortega-Salazar A, Chávez-Medina J, Cremieux-Grimaldi JC, Correa-Morales F, Hernández-Gaona G, Méndez-Galván JF, Beaty BJ (2006) Antibodies to West Nile virus in asymptomatic mammals, birds, and reptiles in the Yucatan Peninsula of Mexico. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 74(5), 908–914. <http://doi.org/74/5/908> [pii] [Online January 18, 2016].

- Farfan-Ale JA, Loroño-Pino MA, Garcia-Rejon JE, Hovav E, Powers AM, Lin M, Karin S, Dorman KS, Platt KB, Bartholomay LC, Soto V, Beaty BJ, Lanciotti RS, Blitvich BJ (2009) Detection of RNA from a novel West Nile-like virus and high prevalence of an insect-specific flavivirus in mosquitoes in the Yucatan Peninsula of Mexico. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 80(1), 85–95. <http://doi.org/80/1/85> [pii] [Online January 18, 2016].
- Farfan-Ale JA, Loroño-Pino MA, Garcia-Rejon JE, Soto V, Lin M, Staley M, Dorman KS, Bartholomay LC, Hovav E, Blitvich BJ (2010) Detection of flaviviruses and orthobunyaviruses in mosquitoes in the Yucatan Peninsula of Mexico in (2008). *Vector Borne Zoonotic Dis*, 10(8), 777–83. <http://doi.org/10.1089/vbz.2009.0196> [Online January 19, 2016].
- Felsenstein J (1985) Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* 39:783-791.
- Fernández-Salas I, Contreras-Cordero JF, Blitvich BJ, González-Rojas JI, Cavazos-Alvarez A, Marlenee NL, Cropp BC (2003) Serologic Evidence of West Nile Virus Infection in Birds, Tamaulipas State, Mexico. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 3(4), 209–213.
- García-García JA, Reding-Bernal A, López-Alvarenga JC (2013) Cálculo del tamaño de la muestra en investigación en educación médica. *Investigación En Educación Médica*, 2(8), 217–224. [http://doi.org/10.1016/S2007-5057\(13\)72715-7](http://doi.org/10.1016/S2007-5057(13)72715-7) [Online February 25, 2016].
- Ferreira GA, Nakano-Oliveira E, Genaro G, Lacerda-Chaves AK (2013) Diet of the coati *Nasua nasua* (Carnivora: Procyonidae) in an area of woodland inserted in an urban environment in Brazil. *Revista Chilena de Historia Natural*, 86(1), 95–102. <http://doi.org/10.4067/S0716-078X2013000100008> [Online December 10, 2016].
- Greenberg JA, Lujan DA, DiMenna MA, Wearing HJ, Hofkin BV (2013) Identification of blood meal sources in *Aedes vexans* and *Culex quinquefasciatus* in Bernalillo County, New Mexico. *Journal of Insect Science (Online)*, 13, 75. <http://doi.org/10.1673/031.013.7501> [Online January 16, 2017].
- Gu W, Novak RJ (2004) Short report: Detection probability of arbovirus infection in mosquito populations. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 71(5), pp.636–638.
- Guerrero-Sánchez S, Cuevas-Romero S, Nemeth NM, Trujillo-Olivera MTJ, Worwa G, Dupuis A, Estrada-Franco JG (2011) West Nile virus infection of birds, Mexico. *Emerging Infectious Diseases*, 17(12), 2245–2252. <http://doi.org/http://dx.doi.org/10.3201/eid1712.110294> [Online June 22, 2016].
- Hidalgo-Martínez A, Puerto FI, Farfán-Ale JA, García-Rejón JE, Rosado-Paredes EDP, Méndez-Galván J, Figueroa-Ocampo R, Takashima I, Ramos C (2008) Prevalencia de infección por el virus del Nilo occidental en dos zoológicos del estado de Tabasco. *Salud Pública de México*, 50(1), 76–85. <http://doi.org/10.1590/S0036-36342008000100014> [Online April 22, 2016].
- Komar N, Clark GG (2006) West Nile virus activity in Latin America and the Caribbean. *Pan American Journal of Public Health*, 19(2), 112–7. <http://doi.org/S102049892006000200006> [pii] [Online April 27, 2016].

- Komar N, Lanciotti R, Bowen R, Langevin S, Bunning M. (2002). Detection of West Nile virus in oral and cloacal swabs collected from bird carcasses. *Emerging Infectious Diseases*, 8(7), 741–742. <http://doi.org/10.3201/eid0807.020157> [Online April 27, 2016].
- Lanciotti RS, Roehrig JT, Deubel V, Smith J, Parker M, Steele K, Crise B, Volpe KE, Crabtree MB, Scherret JH, Hall RA, MacKenzie JS, Cropp CB, Panigrahy B, Ostlund E, Schmitt B, Malkinson M, Banet C, Weissman J, Komar N, Savage HM, Stone W, McNamara T, Gubler DJ (1999) Origin of the West Nile virus responsible for an outbreak of encephalitis in the northeastern United States. *Science (New York, N.Y.)*, 286(5448), 2333–7. <http://doi.org/10.1126/science.286.5448.2333> [Online November 04, 2016].
- Langevin SA, Bunning M, Davis B, Komar N (2001) Experimental infection of chickens as candidate sentinels for West Nile virus. *Emerging Infectious Diseases*, 7(4), 726–729. <http://doi.org/10.3201/eid0704.017422> [Online July 18, 2016].
- Machain-Williams C, Padilla-Paz SE, Weber M, Cetina-Trejo R, Juarez-Ordaz JA, Loroño-Pino MA, Ulloa A, Wang C, Garcia-Rejon JE, Blitvich BJ (2013) Antibodies to West Nile virus in wild and farmed crocodiles in southeastern Mexico. *Journal of Wildlife Diseases*, 49(September 2007), 690–3. <http://doi.org/10.7589/2012-11-290> [Online November 08, 2016].
- Mackenzie JS, Gubler DJ, Petersen LR (2004) Emerging flaviviruses: the spread and resurgence of Japanese encephalitis, West Nile and dengue viruses. *Nature medicine*, 10(12 Suppl), pp.S98–S109. [Online February 16, 2016].
- Richards SL, Ponnusamy L, Unnasch TR, Hassan HK, Apperson CS (2006) Host-feeding patterns of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in relation to availability of human and domestic animals in suburban landscapes of central North Carolina. *Journal of Medical Entomology*, 43(3), 543–551. [http://doi.org/10.1603/0022-2585\(2006\)43\[543:HPOAAD\]2.0.CO;2](http://doi.org/10.1603/0022-2585(2006)43[543:HPOAAD]2.0.CO;2) [Online December 20, 2016].
- Saitou N, Nei M (1987). The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4:406-425.
- Scaramozzino N, Crance JM, Jouan A, DeBriel DA, Stoll F, Garin D (2001) Comparison of flavivirus universal primer pairs and development of a rapid, highly sensitive heminested reverse transcription-PCR assay for detection of flaviviruses targeted to a conserved region of the NS5 gene sequences. *Journal of Clinical Microbiology*, 39(5), 1922–1927. JOUR. [Online January 08, 2016].
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S (2013) MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*: 30 2725-2729.
- Thongsripong P, Green A, Kittayapong P, Kapan D, Wilcox B, Bennett S (2013) Mosquito Vector Diversity across Habitats in Central Thailand Endemic for Dengue and Other Arthropod-Borne Diseases. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 7(10). <http://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002507> [Online November 21, 2016].
- Swaddle JP, Calos SE (2008) Increased avian diversity is associated with lower incidence of human West Nile infection: Observation of the dilution effect. *PLoS ONE* 3(6): e2488. <http://doi:10.1371/journal.pone.0002488> [Online November 22, 2016].

- Ulloa A, Ferguson HH, Méndez-Sánchez JD, Danis-Lozano R, Casas-Martínez M, Bond JG, Rodríguez-Pérez MA (2009) West Nile Virus Activity in Mosquitoes and Domestic Animals in Chiapas, México. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 9(5), 555–560. <http://doi.org/10.1089/vbz.2008.0087> [Online February 06, 2016].
- Weaver SC (2013) Urbanization and geographic expansion of zoonotic arboviral diseases: Mechanisms and potential strategies for prevention. *Trends in Microbiology*, 21(8), 360–363. <http://doi.org/10.1016/j.tim.2013.03.003> [Online October 25, 2016].
- Zinser M, Ramberg F, Willott E (2004) *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) as a potential West Nile virus vector in Tucson, Arizona: blood meal analysis indicates feeding on both humans and birds. *Journal of Insect Science*, 4:20, Available online: insectscience.org/4.20 [Online January 28, 2017].

Table 1. Abundance of mosquitoes collected in IPP site per season collected using Centers for Disease Control and Prevention backpack-mounted aspirator in Quintana Roo state, Mexico

Season	Species	A1	A2	Females	Males	Total
Dry	<i>Aedes aegypti</i>	2	5	7	6	13
	<i>Aedes taeniorhynchus</i>	193	13	206	5	211
	<i>Anopheles albimanus</i>	0	0	0	1	1
	<i>Culex quinquefasciatus</i>	94	10	104	297	401
	Total	289	28^B	317^C (51%)	310 (49%)	627^D (100%)
Rain	<i>Aedes aegypti</i>	2	0	2	0	2
	<i>Aedes taeniorhynchus</i>	108	1	109	2366	2475
	<i>Culex interrogator</i>	9	1	10	0	10
	<i>Culex quinquefasciatus</i>	11	5	16	17	33
	<i>Psorophora ferox</i>	87	4	91	42	133
Total	217	11^B	228^C (9%)	2425 (91%)	2653^D (100%)	

A1: Unfed; A2: Freshly fed mosquitoes, blood fed in the process of digestion and gravid; **B**: $t=1.653$, $df=10$, $p=0.129$; **C**: $t=0.945$, $df=10$, $p=0.367$; **D**: $U=16$, $Z=-0.320$, $p=0.749$.

Table 2. Abundance of mosquitoes collected in XH site per season collected using Centers for Disease Control and Prevention backpack-mounted aspirator in Quintana Roo state, Mexico.

Season	Species	A1	A2	Females	Males	Total
Dry	<i>Aedes aegypti</i>	29	94	123	78	201
	<i>Aedes taeniorhynchus</i>	3	3	6	0	6
	<i>Culex nigripalpus</i>	1	0	1	0	1
	<i>Culex quinquefasciatus</i>	144	99	243	211	454
	<i>Mansonia titillans</i>	6	0	6	0	6
Total	183	196^B	379^C (57%)	289(43%)	668^D (100%)	
Rain	<i>Aedes aegypti</i>	26	43	69	63	132
	<i>Aedes taeniorhynchus</i>	5	3	8	0	8
	<i>Anopheles albinamus</i>	1	0	1	0	1
	<i>Culex nigripalpus</i>	5	24	29	152	181
	<i>Culex quinquefasciatus</i>	165	95	260	625	885
<i>Mansonia titillans</i>	0	2	2	0	2	
Total	202	167^B	369^C (31%)	840(69%)	1209^D (100%)	

A1: Unfed; A2: Freshly fed mosquitoes, blood fed in the process of digestion and gravid; **B**: $t=0.574$, $df=10$, $p=0.579$; **C**: $t=0.088$, $df=10$, $p=0.932$; **D**: $U=5.00$, $Z=-2.082$, $p=0.037$

Table 3. Abundance of mosquitoes collected in IPP site per season collected using coat-associated (*Nasua narica*) Magoon trap in Quintana Roo state, Mexico

Season	Species	A1	A2	Females	Males	Total
Dry	<i>Aedes aegypti</i>	0	0	0	2	2
	<i>Aedes taeniorhynchus</i>	9	8	17	3	20
	<i>Culex quinquefasciatus</i>	7	6	13	4	17
	Total	16	14^B	30^C (77%)	9 (23%)	39 (100%)
Rain	<i>Aedes aegypti</i>	0	1	1	0	1
	<i>Aedes taeniorhynchus</i>	11	7	18	1	19
	<i>Anopheles albimanus</i>	0	1	1	0	1
	<i>Culex quinquefasciatus</i>	4	18	22	1	23
	<i>Mansonia titillans</i>	0	1	1	0	1
	<i>Psorophora ferox</i>	4	1	5	0	5
	Total	19	29^B	48^C (96%)	2 (4%)	50 (100%)

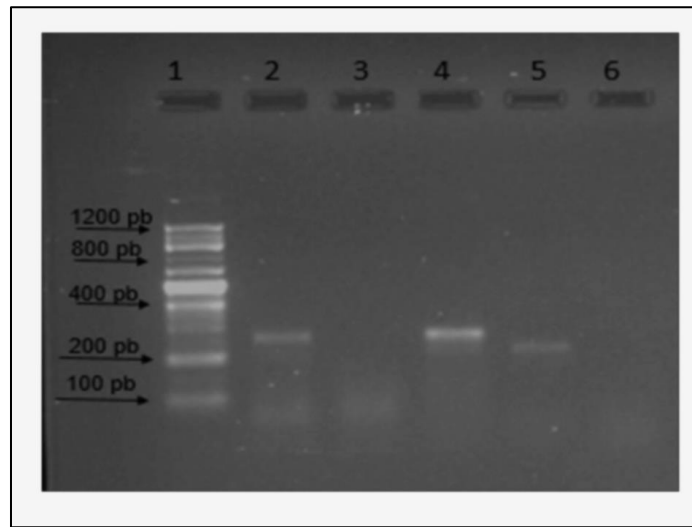
A1: Unfed; A2: Freshly fed mosquitoes, blood fed in the process of digestion and gravid; **B**: $t=-2.109$, $df=10$, $p=0.061$; **C**: $U=08.00$, $Z=-1.615$, $p=0.106$.

Table 4. Abundance of mosquitoes collected in XH site per season collected using Magoon trap in Quintana Roo state, Mexico

Season	Species	A1	A2	Females	Males	Total
Dry	<i>Aedes aegypti</i>	1	0	1	1	2
	<i>Aedes taeniorhynchus</i>	12	6	18	2	20
	<i>Culex quinquefasciatus</i>	10	68	78	24	102
	<i>Haemagogus equinus</i>	1	2	3	0	3
	<i>Mansonia titillans</i>	2	0	2	0	2
	Total	26	76^B	102^C (79%)	27 (21%)	129 (100%)
Rain	<i>Aedes fulvus pallens</i>	4	0	4	0	4
	<i>Aedes taeniorhynchus</i>	43	7	50	0	50
	<i>Culex nigripalpus</i>	1	13	14	1	15
	<i>Culex quinquefasciatus</i>	26	35	61	66	127
	<i>Mansonia titillans</i>	5	2	7	2	9
Total	79	57^B	136^C (66%)	69 (34%)	205 (100%)	

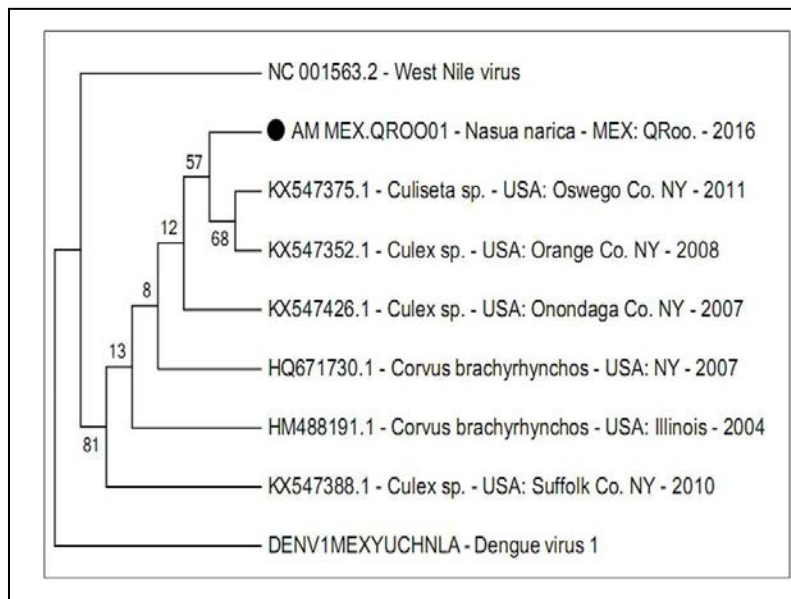
A1: Unfed; A2: Freshly fed mosquitoes, blood fed in the process of digestion and gravid **B**: $t=0.380$, $df=10$, $p=0.699$; **C**: $t=0.467$, $df=10$, $p=0.650$

Figure 1. Amplification by RT-PCR of RNA of coati (*Nasua narica*) serum pool samples of family *Flaviviridae* in IPP and XH sites in Quintana Roo state, Mexico.



Lane1= Molecular size marker 100 a 1200 pb; size band 250 pb; Lane 2= Positive pool coati serum sample corresponding to site IPP in dry season; Lane 3= Negative pool coati serum sample corresponding to site IPP in dry season; Lane 4= Positive pool from coati serum sample corresponding to site XH in wet season. Lane 5= Positive control (Dengue virus-1); Lane 6= Negative control (PCR reactivities).

Figure 2. Phylogenetic analysis AM_MEX.QROO01 of WNV-positive (by RT-PCR) sample of coaties (*Nasua narica*) in Quintana Roo state, Mexico.



NC_001563.2: West Nile Virus reference sequence; DENV1MEXYUCHNLA: Dengue virus serotype 1 reference sequence; AM_MEX.QROO01: sequence isolated in this study. Compared sequences are represented in the phylogenetic tree with: GenBank - Host access number where it was isolated - Place where the sequence was isolated - year of isolation.