

Protocolo para el muestreo de Culícidos

Proyecto SPVECTORSURV

1. Introducción

En el presente documento se explica el protocolo de muestreo de Culícidos dentro del proyecto SPVECTORSURV en el que el objetivo principal es la vigilancia de especies que son potencialmente transmisoras del virus de la fiebre del Nilo Occidental y del virus de la fiebre del valle del Rift.

El protocolo se adecúa a los objetivos del proyecto y tiene en cuenta una serie de recomendaciones para la realización de los muestreos. Cada equipo, en función de sus posibilidades, podrá adaptar dichas recomendaciones siempre que se cumplan una serie de parámetros mínimos.

2. Tipo de trampa

Se ha optado por la trampa BG- PRO de la empresa Biogents (<https://eu.biogents.com/bg-pro/?lang=es>) por las siguientes razones:

- Se trata de una trampa versátil, que puede utilizarse tanto como una trampa CDC (colocada en algún soporte) o como trampa BG-Sentinel colocada en el suelo.
- Permite la utilización de diferentes tipos de atrayentes: fuente de CO₂ en forma de hielo seco o mediante bombona de CO₂; atrayentes semioquímicos (p.e.: BGMozziBait a base de amoníaco, ácido láctico y ácido caproico); luz mediante dispositivo LED (p.e.: LEDs 1,25-1,5 W).
- Se trata de una trampa ligera, que ocupa poco espacio cuando se almacena y que es fácil de transportar.
- Es una trampa que puede utilizar como fuente de energía tanto la corriente eléctrica mediante transformador, baterías de 6V (baterías de moto) o baterías de móvil de 5V (tipo power bank).

Si no se dispone de BG-PRO se pueden utilizar otras trampas que sean habituales en el muestreo de mosquitos, como BG- Sentinel o Mini-CDC.

3. Metodología para el uso de las trampas

En la siguiente tabla se presentan los diferentes componentes y sus parámetros utilizados en el muestreo:

Sistema	Sistema BG-Pro	Imagen	Parámetros
Trampa	BG- Pro		NA

		 Configuración BG-Sentinel	
Fuente de CO ₂	Botella 10 L CO ₂ * o 1kg de CO ₂ en depósito superior por noche de muestreo		NA
Temporizador CO ₂	Temporizador Biogents		12h (día 6 a 18h y/o noche 18 a 6h) o 24h
Sistema CO ₂	BGBoosterCO2		0,5 kg/ día
Batería	6V/13Ah de plomo uso cíclico o Powerbank de 5V (batería externa móviles).		Carga para que pueda funcionar mínimo 12h (una noche) en el caso de especies crepusculares y nocturnas y mínimo 14 h (día/crepúsculo/noche) en el caso de las especies diurnas.

Atrayente químico	BG-MozziBait		Cambio cada 2 meses
Atrayente físico	LEDs de luz blanca		Funcionamiento el mismo tiempo que la trampa
Transformadores	Power supply BG-Pro		12h-14h de funcionamiento día y/o noche en función del tipo de muestreo

* Duración 40 días si la botella está 24h abierta con un flujo de 0,5 kg/día

3.1. Metodología para la captura de Culicinos y Aedinos

En el caso de que se quiera usar un único sistema para la captura de especies de los géneros *Culex* y *Aedes*, se recomienda el siguiente sistema:

- **Sistema recomendado:** trampa tipo BG-PRO en configuración trampa CDC. La trampa dispone de una abertura en la parte superior con un sistema de auto cierre, por el cual entran los ejemplares adultos que son succionados por un ventilador que los retiene en una red colectora de malla fina colocada a la salida del ventilador. La trampa va dotada de un difusor de CO₂ conectado a una botella de CO₂ (p.e.: botella de 20 kg) o depósito de hielo seco, ambos sistemas dotados de manómetro automatizado con la que se establece un flujo de 0,5 kg/ día. El funcionamiento de la trampa se realiza mediante la conexión de baterías de 6V o power banks de 5V o mediante transformador enchufado a la red. En este caso se recomienda que la trampa funcione 24h de manera ininterrumpida.
- **Colocación de la trampa:** se colocará colgada en algún soporte (rama o similar) en la zona de muestreo seleccionada entre 1,5 y 2 m del suelo en un lugar resguardado del viento y de la radiación directa del sol (si es posible). Debe evitarse el contacto con las ramas o con cualquier otro elemento de alrededor que pueda dañar la trampa. Una vez colocada, se comprobará que todos los elementos funcionan de manera adecuada: ventilador, difusión de CO₂ y que las mallas de recolección están sujetas a la trampa. Siempre que se use botella de CO₂ se debe asegurar mediante bridas a algún soporte para evitar que se tumbe. Para comprobar la salida de CO₂ se puede introducir el tubo difusor dentro de un recipiente con agua y ver si salen burbujas.

- **Frecuencia de muestreo:** se debe realizar un muestreo por mes. En el caso de que el muestreo se haya realizado en condiciones ambientales desfavorables, conviene repetir el muestreo si fuese posible.

3.2. Metodología para la captura de Culicinos

En el caso de que se quiera usar un sistema para la captura de especies del género *Culex* que tienen hábitos crepusculares y nocturnos, se recomienda el siguiente sistema:

- **Sistema recomendado:** trampa tipo BG-PRO en configuración trampa CDC. Se pueden utilizar los mismos parámetros que en el caso anterior con la diferencia de que se prescinde del atrayente (BG-MozziBait) y se utiliza solamente CO₂ como atrayente. En este caso se recomienda que la trampa funcione un mínimo de 12h de manera ininterrumpida desde el crepúsculo y hasta el amanecer. De manera opcional se puede utilizar, además del CO₂, una fuente de luz (LEDs de color blanco) como atrayente, sin embargo, hay que valorar que se capturará un número mayor de insectos no diana. En el caso de que no se disponga de CO₂ en sistema de botella o de hielo seco, entonces la configuración mínima opcional sería mediante la atracción lumínica de LEDs. Hay que tener en cuenta que, si se coloca el atrayente lumínico, la batería se consumirá de manera más rápida.
- **Colocación de la trampa:** se colocará colgada en algún soporte (rama o similar) en la zona de muestreo seleccionada entre 1,5 y 2 m del suelo en un lugar resguardado del viento. Debe evitarse el contacto con las ramas o con cualquier otro elemento de alrededor que pueda dañar la trampa. Una vez colocada, se comprobará que todos los elementos funcionan de manera adecuada: ventilador, difusión de CO₂ y que las mallas de recolección están sujetas a la trampa. Siempre que se use botella de CO₂ se debe asegurar mediante bridas a algún soporte para evitar que se tumbe. En el caso opcional de que se use luz como atrayente, se debe comprobar su funcionamiento y evitar colocar la trampa en lugares donde haya contaminación lumínica intensa que pueda interferir con la trampa.

Frecuencia de muestreo: se debe realizar un muestreo por mes. En caso de que sea posible, se recomienda la realización de un día y una noche de muestreo. En el caso de que el muestreo se haya realizado en condiciones ambientales desfavorables, conviene repetir el muestreo, si fuese posible.

3.3. Metodología para la captura de Aedinos

En el caso de que se quiera usar un sistema para la captura de especies del género *Aedes* que puedan tener hábitos diurnos y crepusculares, se recomienda el siguiente sistema:

- **Sistema recomendado:** trampa tipo BG-PRO en configuración trampa BG-Sentinel. La trampa dispone de una abertura en la parte superior con un sistema de auto cierre, por el cual entran los ejemplares adultos que son succionados por un ventilador que los retiene en una red colectora de malla fina colocada en la entrada del ventilador (diferente por tanto a la configuración CDC). Los atrayentes son los mismos que los utilizados en la configuración 3.1: atrayente (BG-MozziBait) y difusor de CO₂ conectado a una botella de CO₂ (p.e.: botella de 20 kg) o depósito de hielo seco, ambos sistemas dotados de manómetro automatizado con la que se

establece un flujo de 0,5 kg/ día. El funcionamiento de la trampa se realiza mediante la conexión de baterías de 6V o power banks de 5V o mediante transformador enchufado a la red. En este caso se recomienda que la trampa funcione un mínimo de 14h de manera ininterrumpida durante el día, el crepúsculo y la noche.

- **Colocación de la trampa:** se colocará sobre el terreno de la zona de muestreo seleccionada, en lugar con sombra y entre la vegetación, pero sin que esta impida la difusión de los atrayentes y/o la entrada de los mosquitos en la trampa. Debe evitarse el contacto con las ramas o con cualquier otro elemento de alrededor que pueda dañar la trampa. Una vez colocada, se comprobará que todos los elementos funcionan de manera adecuada: ventilador, difusión de CO₂ y que las mallas de recolección están sujetas a la trampa. Siempre que se use botella de CO₂ se debe asegurar mediante bridas a algún soporte para evitar que se tumbe.
- **Frecuencia de muestreo:** se debe realizar como mínimo una jornada de muestreo al mes, incluyendo horas antes del crepúsculo, horas crepusculares y la noche. En el caso de que el muestreo se haya realizado en condiciones ambientales desfavorables, conviene repetir el muestreo, si fuese posible.

4. Recogida y conservación de las muestras

Las muestras se recogerán lo antes posible al día o noche siguiente de su colocación la mañana siguiente a la colocación de la trampa.

La recogida de la muestra se hará siempre conservando la cadena de frío, ya sea utilizando hielo seco o neveras dotadas de acumuladores térmicos. En el caso de que la recogida de la muestra implique una larga distancia, se podrán utilizar neveras eléctricas portátiles, hielo seco o recipientes de nitrógeno líquido. Una vez en el laboratorio, la muestra se conservará a -20°C durante un máximo de 48h hasta el momento de su identificación y posterior conservación a -80°C

5. Identificación de los ejemplares y análisis virológico

La identificación se realizará siempre conservando la cadena de frío, bien mediante mesa de frío o acumuladores térmicos. Los ejemplares identificados (hembras) serán agrupados por especies en lotes de 20 hembras no alimentadas de la misma especie capturados en la misma localidad y fecha que serán conservados en tubos ependorf libres de RNAsas a -80°C. Los ejemplares se enviarán en hielo seco o conservados en etanol 70% al laboratorio designado para el análisis de detección de virus. En el caso de capturas muy abundantes se clasificarán los primeros 1 000 ejemplares y el resto se podrá extrapolar por peso mediante el uso de una balanza de precisión 0.001 g o inferior.

Se contempla el análisis de 30 pooles (20 hembras/pool) por lugar de muestreo para determinar la presencia de virus con una tasa de infección del 0.005 (0.5%).

Las hembras alimentadas se conservarán en ependorf o crio tubos a -80°C para futuros estudios sobre las preferencias alimentarias.

Los ejemplares adultos de mosquitos podrán ser identificados utilizando las siguientes referencias:

Becker, N., Petrić, D., Zgomba, M., Boase, C., Madon, M., Dahl, C. and Kaiser, A., 2020. Mosquitoes – Identification, Ecology and Control. Springer.

Gunay F, Picard M, and Robert V, 2018. MosKeyTool, an interactive identification key for mosquitoes of Euro-Mediterranean. <https://www.medilabsecure.com/moskeytool.html> (last accessed 7 Feb 2022)

6. Información de apoyo

Plan Nacional de Prevención, Vigilancia y Control de las Enfermedades Transmitidas por Vectores
https://www.sanidad.gob.es/profesionales/saludPublica/ccayes/activPreparacionRespuesta/doc/PLAN_DE_VECTORES.pdf

WNV-Disease Profile (EFSA). <https://animal-diseases.efsa.europa.eu/WNFV>

RVF- Disease Profile (EFSA). <https://animal-diseases.efsa.europa.eu/RVFEV>

Autores

- Miguel Ángel Miranda (ZAP-UIB; INAGEA-UIB)
- Carlos Barceló (ZAP-UIB)
- Jordi Figuerola (EBD-CSIC; CIBERESP)
- Sarah Delacour (UNIZAR)
- Ignacio Ruiz Arrondo (UNIZAR)
- Ignacio de Blas (UNIZAR)