



Protocolo de vigilancia entomo-virológica frente al virus del Nilo Occidental



Equipo redactor: Jordi Figuerola^{1,3}, Shirin Taheri¹, Mikel A. González^{1,3}, María José Ruiz-López^{1,3}, Sergio Magallanes^{1,3}, Ana Vázquez^{2,3}.

¹Estación Biológica de Doñana (CSIC), ²Centro Nacional de Microbiología (ISCIII),
³CIBER Epidemiología y Salud Pública.

Memoria realizada como parte del contrato *Evaluación de riesgo para detección de métodos y puntos de interés para la vigilancia entomológica de la Fiebre del Nilo Occidental en España* en el marco del proyecto SPVECTORSURV, financiado con fondos de la Unión Europea del programa EU4HEALTH. *Scaling up One health vector-borne zoonotic diseases monitoring and surveillance in Spain (SPVECTORSURV)*. Proyecto 101132820 de la convocatoria EU4H-2022-DGA-MS-IBA3

Coordinado por los Ministerios de Agricultura, Pesca y Alimentación, Sanidad y Transición ecológica y reto demográfico y la Fundación Estatal Salud, Infancia y Bienestar Social (FCSAI) y financiado por la Unión Europea (European Health and Digital Executive Agency, HADEA).



Este documento recoge los protocolos de vigilancia entomológica utilizados desde el 2020 por la Estación Biológica de Doñana-CSIC y el Centro Nacional de Microbiología-ISCIII para la detección del virus del Nilo Occidental (VNO) en muestras de mosquitos.

Estas técnicas se han aplicado tanto en los distintos proyectos de investigación realizados por estas entidades en Andalucía, así como para el “Servicio para la realización de la vigilancia entomológica para la identificación de agentes patógenos en vectores artrópodos” ejecutado por la Estación Biológica de Doñana para la Consejería de Salud y Familias de la Junta de Andalucía entre 2022 y 2024.

1. Selección y localización de trampas

La selección de las zonas para colocar las trampas está determinada por los objetivos del programa de vigilancia, en este caso, la detección temprana de la circulación del virus del Nilo Occidental en un territorio. Para ello, se priorizan zonas con abundancia de mosquitos, especialmente de las principales especies vectoras del virus: *Culex perexiguus*, *Culex pipiens* y *Culex modestus* (Muñoz et al. 2012, Engler et al. 2013, Rizzoli et al. 2015) en el caso de Andalucía. Por este motivo las zonas elegidas deben estar cercanas a cultivos irrigados (p.e. arrozales), arroyos y riberas, lagunas temporales, marismas de agua dulce, u otros ambientes que favorezcan la abundancia de estas especies, como centros de tratamiento de aguas (EDAR) (Roiz et al. 2015, Ferraguti et al. 2016). No es prioritario la colocación de las trampas en los interiores de las zonas urbanas, ya que el objetivo es detectar el virus antes de que se produzcan casos de infección en humanos, seleccionando prioritariamente áreas con alta población de mosquitos en entornos próximos a áreas habitadas.

Para el emplazamiento de las trampas en zonas poco conocidas, se recomienda realizar una primera exploración utilizando la capa de Satélite de Google Maps para localizar zonas potencialmente atractivas para estas especies de mosquitos basándonos en los criterios anteriores. Posteriormente, se realizará una visita de la zona para comprobar *in situ* los lugares de muestreo y su adecuación para la instalación de las trampas.

A continuación, se mencionan los criterios más relevantes que se deben de tener en cuenta para la selección de las zonas de colocación de las trampas (Figuras 1 y 2):

- i) **Selección de zonas de bajo tránsito o movimiento humano.** Es fundamental elegir áreas con bajo tránsito humano para evitar que las trampas sean vandalizadas o robadas durante su uso. Este punto es especialmente importante, ya que es frecuente que personas ajenas al proyecto manipulen las trampas, por simple curiosidad, lo que generalmente las deja inoperativas. Por este motivo, además de elegir lugares apartados o poco concurridos, se recomienda etiquetar las trampas con información relevante, como la entidad responsable, el propósito del material de investigación y un número de teléfono de contacto, si es posible.



- ii) **Selección de zonas con vegetación que ofrezcan cobertura.** Las trampas deben ubicarse en áreas con vegetación que las proteja del viento. En zonas abiertas (sin cobertura vegetal o arbórea), es probable que se capturen un número significativamente menor de ejemplares en comparación con aquellas colocadas en zonas con abundante cobertura vegetal. En este punto deben de tenerse cuatro aspectos en cuenta. La abertura de la trampa (zona de succión de los ejemplares) debe permanecer libre de vegetación para que no interfiera en el funcionamiento del ventilador y la pluma de emisión de dióxido de carbono. En segundo lugar, la trampa no debe exponerse directamente al sol ni instalarse sobre superficies sin cobertura vegetal (Figuras 1 y 2). En tercer lugar, el éxito de las capturas se verá favorecido si la trampa se instala en lugares donde en las inmediaciones haya zonas de cría de mosquitos. En último lugar, zonas ventosas son típicamente inadecuadas para la captura de mosquitos, por ese motivo zonas protegidas del viento o con vegetación son más favorables para el éxito de las trampas.



Figura 1. Esquema a la izquierda de una trampa tipo Bg-Sentinel situada correctamente en una zona con cobertura vegetal dejando libre la zona superior para que los mosquitos puedan acercarse con facilidad a la zona de succión de la trampa. En el centro, un emplazamiento inapropiado por exceso de vegetación sobre la abertura de la trampa. A la derecha, un emplazamiento inapropiado por falta de cobertura vegetal.

- iii) **Selección de puntos con fácil acceso y seguridad.** Se deben priorizar lugares donde sea posible estacionar el vehículo en condiciones de seguridad (descampados, zonas de descanso, vías secundarias, caminos rurales, etc.). Además, es fundamental que el acceso a la trampa no implique riesgos para los operarios (e.j. zanjas peligrosas, terrenos escarpados, arcones de carretera o zonas de baja visibilidad como cambios de rasante o curvas, etc.).

La ubicación de las trampas no debe exceder una distancia de 100-200 metros del vehículo, ya que las baterías de las trampas son pesadas y podrían suponer un esfuerzo considerable para los operarios, especialmente en rutas largas con múltiples trampas. También se debe asegurar que el terreno sea firme y de que en caso de lluvias la trampa no quede inundada (Figura 3). De la misma manera, es importante prever problemas de acceso en vehículo durante períodos de lluvias intensas. En última instancia, se debe evitar instalar las trampas en zonas de pastoreo, cosecha o desbroce, para reducir los riesgos de que la trampa se vea dañada.

- iv) **Otras consideraciones.** En algunas ocasiones, se optan por instalar las trampas en propiedades privadas, lo que puede reducir el riesgo de que las



trampas sean vandalizadas. En estos casos, es esencial contactar previamente con el propietario para obtener su autorización y asegurarse de que el acceso a la parcela está disponible en el momento de poner y recoger las trampas, evitando retrasos derivados de la ausencia de las personas responsables de la propiedad.



Figura 2. Imagen de emplazamientos adecuados típicos de trampas de tipo BG-Sentinel con diferentes tipos de cobertura vegetal o protección frente al viento.



Figura 3. Ejemplos de emplazamientos inadecuados de trampas. En las dos primeras fotografías, la trampa (modelo BG-Sentinel) está localizada en una zona de inundación y en la segunda fotografía la trampa (modelo Mosquitaire) está expuesta sin protección vegetal en medio de un jardín.



2. Métodos de trampeo

En el mercado existe una amplia variedad de sistemas de trampeo disponibles para la captura de mosquitos adultos, que abarcan desde enfoques pasivos a activos. Sin embargo, por su robustez y facilidad de uso, se emplean con mayor frecuencia dos tipos:

Trampas de succión-aspiración: tipo BG-Sentinel y tipo CDC

Disponibilidad en el mercado. Ambos tipos de trampa están disponibles en el mercado. No obstante, actualmente hay un desabastecimiento de las trampas CDC (Center Disease Control) convencionales. Estas trampas pueden ser adquiridas directamente a través de sus distribuidores oficiales, Alemania en el caso de la BG-Sentinel, y USA en el caso de las CDC. También hay varios distribuidores nacionales que proveen este material (Figura 4).



Figura 4. Modelos de trampas más empleados para la captura de mosquitos. Modelos BG-Sentinel y CDC, respectivamente.

Adecuación y uso. Ambas trampas son eficaces para la captura de mosquitos y son ampliamente utilizadas en distintos programas de vigilancia en todo el mundo. Los niveles de captura en ambas trampas son similares (Roiz et al. 2012), si bien los datos pueden variar geográficamente. El atrayente utilizado para capturar los mosquitos tiene un efecto mucho más importante sobre la abundancia de las capturas que el tipo de trampa (Roiz et al. 2012). Sin embargo, si el objetivo es obtener datos comparables a lo largo del tiempo, es conveniente utilizar un único tipo de trampa y atrayente, manteniendo la ubicación y características de las trampas constantes.

Funcionamiento. Ambas trampas cuentan con un ventilador que retiene los mosquitos atraídos (Figura 5), normalmente alimentado por una batería de 12 Voltios y 12-18 amperios de potencia (como las utilizadas para motocicletas o similares) (Figura 6). A mayor amperaje, mayor tiempo en funcionamiento de la trampa. Como regla general, para asegurar la máxima energía en el ventilador durante un periodo de 24 h, se recomienda el uso de baterías de al menos 12 amperios. Las trampas CDC también pueden funcionar con baterías de 6V, dependiendo del modelo. Es posible alimentar las trampas con otras fuentes de energía, como pilas alcalinas (Figura 6) o cargadores de móviles de alta potencia.



Asimismo, se puede adaptar el cableado para conectar las trampas a la corriente eléctrica (220 V) si se planea su uso en lugares con acceso permanente a esta fuente.



Figura 5. Ventilador de la trampa CDC y BG-Sentinel, respectivamente.



Figura 6. Ejemplo de batería de plomo (12V) y dispositivo de pilas alcalinas para alimentar con energía las trampas de succión.

Idiosincrasia de las trampas.

- Las trampas CDC suelen ser más costosas que las BG-Sentinel
- Las trampas BG-Sentinel son más robustas y presentan menos problemas de malfuncionamiento que las CDC.
- Las BG-Sentinel incluyen una funda para facilitar su transporte y almacenaje.
- Las trampas CDC incorporan una fuente de luz, mientras que las BG-Sentinel incluyen un adaptador para el uso de BG-Lure, un atrayente específico para mosquitos del género *Aedes*.
- Las trampas CDC traen un “plato” protector contra la lluvia directa. En el modelo BG-Sentinel, este protector se adquiere por separado.
- Las trampas CDC suelen, por lo general, ser más apropiadas para estudios de diversidad de mosquitos ya que cuentan con una fuente de luz.
- Las BG-Sentinel son más fáciles de instalar, ya que no requieren estructuras para colgarlas. Las CDC, al ser más visibles debido a la luz, son más proclives al vandalismo.
- La BG-Sentinel es el modelo utilizado por nuestro equipo de investigación en los proyectos y programas de vigilancia realizados en Andalucía.

Fuentes de atracción. El diseño de cada modelo de trampa busca ser atractivo para los mosquitos. Por ejemplo, las BG-Sentinel tienen una silueta específica y patrones de color atractivos para los mosquitos. El modelo de CDC, en cambio, incluye una fuente de luz (incandescente o fluorescente, según el modelo) (Figura 7), que les permite atraer mosquitos basándose en el principio de fototropismo positivo, aunque el volumen de capturas será reducido.

No obstante, el éxito en las capturas, depende principalmente del uso de dióxido de carbono como atrayente. En los estudios realizados en Andalucía, se utilizaron trampas BG-Sentinel equipadas con aproximadamente 0,5-1 kg de hielo seco como atrayente. El hielo seco o nieve carbónica se comercializa en forma de pellets de diversos tamaños o



en bloques de mayor tamaño. Nosotros recomendamos el uso de pellets de tamaño mediano (> 16 mm). Alternativamente se puede usar dióxido de carbono en su forma gaseosa mediante bombonas (ver siguiente apartado).



Figura 7. Modelos de trampa CDC de origen americano. A la izquierda con luz incandescente y a la derecha con tubo de luz fluorescente (UV/negra).

El hielo seco debe colocarse en un recipiente de poliestirén con una salida en la parte superior conectada a un tubo de PTFE de 2 mm de diámetro interno. Existen multitud de ejemplos de recipientes para almacenar y dispensar el hielo seco, si bien el modelo que se ha empleado es fácil de construir y ha mostrado resultados muy buenos en el programa de vigilancia de Andalucía (Figura 8). Es fundamental que el hielo seco esté confinado en un recipiente de paredes gruesas y aislantes, y que la fuente de CO₂ se ubique junto a la trampa. El tubo debe dirigir el flujo continuo de CO₂ hacia la entrada de la trampa BG.

En regiones menos cálidas, se pueden utilizar cantidades menores de hielo seco, pero es esencial que al recoger las trampas quede algún resto de hielo seco.



Figura 8. Caja de poliestireno de 5 cm de grosor con una salida en la parte superior conectada a un tubo de PTFE de 2 mm de diámetro interno.

Duración del muestreo. Las trampas se instalan por la mañana y se retiran aproximadamente 24 horas después. Este periodo se determina por la duración de las baterías y la necesidad de preservar los posibles virus presentes en las muestras con mosquitos. El uso de CO₂ como atrayente puede aumentar por 100 veces el volumen de las capturas (Roiz et al. 2012), por lo que es crucial asegurarse de que la cantidad de hielo seco utilizada sea suficiente para mantener el flujo continuo de CO₂ durante las 24 horas. El hielo seco sobrante (que queda en el fondo del recipiente de poliespán) se utiliza para matar inmediatamente a los mosquitos capturados y garantizar que se mantiene la cadena de frío hasta su llegada al laboratorio. Es importante que las bolsas (redes) que contienen los mosquitos no estén en contacto directo con el hielo seco para evitar daños en los mosquitos.

Otras fuentes de atracción. En algunos programas de vigilancia, se utilizan bombonas de CO₂ con reguladores de flujo (Figura 9). Mediante el uso de un temporizador se puede regular en qué momento del día se libera el CO₂. Estos equipos pueden operar sin intervención humana por periodos largos de tiempo y normalmente se instalan dentro de una caja metálica o protección para evitar su manipulación. Sin embargo, si se van a realizar análisis para la detección de virus sigue siendo necesario realizar dos visitas separadas por 24 horas, la primera para eliminar los mosquitos antiguos y la segunda para recoger los mosquitos que han caído en las últimas 24 horas. Estos equipos requieren normalmente la conexión a la red eléctrica o el uso de una placa solar para asegurar su funcionamiento durante periodos prolongados de tiempo. La manipulación de bombonas de CO₂ implica tomar medidas de seguridad adicionales en el transporte y también debe tenerse en cuenta su elevado peso en la manipulación. Por tanto, considerando, que, en el transporte de mosquitos, para mantener la cadena de frío, sigue siendo necesario disponer de hielo seco, solo se recomienda esta metodología para estudios faunísticos que no requieran de análisis virológico, o en aquellos emplazamientos donde sea difícil obtener hielo seco.

La tercera forma de generar un flujo de CO₂ es a través de la fermentación de azúcar, agua y levadura activada (*Saccharomyces cerevisiae*). Aunque esta forma se utiliza en algunos países, presenta bastantes inconvenientes. En primer lugar, la cantidad de dióxido



de carbono generado es irregular y únicamente alcanza los niveles deseados durante un periodo corto de tiempo. En segundo lugar, pueden liberarse subproductos que interfieren con el proceso de olfacción de los mosquitos.

Existen otros atrayentes comerciales en forma de tabletas, sobres o cartuchos que emiten olores atractivos para los mosquitos (Figura 10). Estos productos son especialmente efectivos para capturar mosquitos del género *Aedes*. Sin embargo, también tiene un cierto efecto en atraer mosquitos del género *Culex*, si bien su eficacia es muy inferior al uso de CO₂.



Figura 9. Trampas CDC equipadas con bombonas de CO₂.



Figura 10. Otros atrayentes disponibles en el mercado en forma de tabletas, sobres o cartuchos que desprenden olores atractivos para los mosquitos.



Material de campo, carga y transporte

Es fundamental asegurarse de contar con todo el material necesario para la realización de las tareas de campo, así como llevar material de repuesto (e.j. redes y baterías).

Previo al inicio del viaje, se debe calcular el número de puntos necesarios que incluye la ruta. Se recomienda llevar siempre una trampa y una batería adicional como reemplazo.

- Cajas de poliestireno
- Baterías cargadas
- Trampas
- Redes de captura
- Etiquetas
- Rotuladores y lápices
- Pala de hielo
- Hielo seco

Carga de las baterías. Las baterías deben cargarse y almacenarse tras su uso en lugares habilitados especialmente para este propósito. Es importante recordar que la carga de baterías puede generar vapores de hidrógeno, por lo que el espacio destinado para la carga debe estar ventilado y preparado para evitar riesgos (Figura 11). No deben cargarse las baterías en los espacios de trabajo de oficina.



Figura 11. Sala habilitada para la carga simultánea de hasta 60 baterías.

Transporte. Es recomendable la colocación del material de trampeo de forma ordenada en el vehículo con el fin de evitar caídas, golpes y roturas del material durante el transporte (Figura 12).



Figura 12. Distribución del material de captura de mosquitos en el interior del vehículo con todo el material perfectamente ordenado y asegurado.

Colocación y recogida de trampas

Colocación de trampas. Una vez seleccionado los lugares de colocación de las trampas, es recomendable colocar la batería en el interior de la trampa, así permanece protegida de los factores externos y fuera del alcance de animales (Figura 13). Esto solo es posible hacerlo con las trampas BG-Sentinel no con las CDC.



Figura 13. Colocación de la batería en el interior de la trampa BG-Sentinel.



Es imprescindible identificar la procedencia de cada uno de los colectores de mosquitos, para ello introduciremos una etiqueta en el interior de la bolsa colectora (redes) al colocar la trampa donde se indique: Fecha de recogida de la trampa, zona o punto de colocación de la trampa, técnico encargado de la colocación de la trampa (Figura 14).



Figura 14. Etiqueta con los datos del recolector, fecha, punto de muestreo dentro de la red de la BG-Sentinel.

A continuación, se llena la caja de polietileno con aproximadamente 1 Kg de hielo seco. Los pellets de hielo seco los introducimos en la caja con ayuda de una pala de plástico (Figura 15). Es importante recordar que el hielo seco no debe entrar en contacto directo con la piel, ya que se encuentra a (-78.5 °C) lo que puede provocar quemaduras por frío en caso de contacto prolongado. Idealmente la tapa de la caja debe encajar perfectamente en la base de la caja para evitar fugas de gas. De no ser así, se debe colocar un peso sobre la tapa para evitar que la presión del CO₂, el viento o los animales levanten la tapa de la caja. En la Figura 16 se resume el material necesario para la colocación de una trampa.



Figura 15. Colocación de hielo seco en forma de pellets en la caja de poliespán.



Recogida de trampas. En esta fase hay que tener en cuenta dos factores importantes. El primero, extraer la malla de capturas evitando la fuga de los mosquitos. Para ello, sin sacar el embudo y la malla de la zona de aspiración de la trampa, retiramos el embudo y cerraremos la bolsa con el cierre manteniendo la bolsa colectora en todo momento en la zona de succión del ventilador para evitar la fuga de mosquitos. Una vez retirada la red y asegurado el cierre de esta, la colocaremos en hielo seco, para matar y conservar correctamente los mosquitos hasta que lleguen al laboratorio.



Figura16. Resumen de todo el material de campo necesario para la realización de los muestreos entomológicos

En segundo lugar, algunas baterías en ocasiones pueden fallar tras su uso repetido, por lo que deben descartarse. En este punto se debe prestar atención en el momento de la recogida de las trampas verificar que el ventilador continúa funcionando a su máximo rendimiento, de no ser así, comprobar si ha habido un fallo en la carga o bien la batería esta dañada. Con el tiempo, las baterías van perdiendo su potencia y es necesario reemplazarlas para un rendimiento óptimo de las trampas.

4. CONSERVACIÓN, IDENTIFICACIÓN Y PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

Conservación de las muestras. Una vez en el laboratorio, las bolsas o redes con el contenido de mosquitos se pueden procesar inmediatamente o conservar, preferentemente en frío congeladores con temperaturas de -80°C . Si no existe alternativa, se almacenarán a -20°C o -30°C intentando que el material se procese con la mayor brevedad posible. En el caso de que se necesite reutilizar la bolsa para nuevas capturas, se pueden transferir los mosquitos a una placa de Petri u otro tipo de vial.

Material óptico. Para la identificación de los mosquitos es necesario usar una lupa binocular o lupa estereoscópica acompañada de una potente fuente de luz, preferente un iluminador de luz fría. Esta lupa debe tener una magnificación final en el rango de 20X-



60X, que se pueden adquirir en el mercado desde 200 Euros. Sin embargo, para un uso profesional y diario es recomendable la adquisición de un dispositivo de mayor calidad óptica, que requieren una mayor inversión económica (6.000-9.000 Euros), con el fin de facilitar y agilizar el trabajo de identificación de los mosquitos. En nuestro caso utilizamos los equipos Leica S Apo Stereomicroscope y Leica Ivesta. El uso de lupas de mano para la identificación de mosquitos no permite asegurar que la identificación sea correcta. Los microscopios digitales pueden ser una opción económica, pero la resolución suele ser más baja que las lupas binoculares y en ocasiones la profundidad de enfoque es reducida y no permite ver los mosquitos en su conjunto dificultando su identificación (Figura 17).



Figura 17. Microscopio digital y lupa binocular para el estudio de los mosquitos, respectivamente.

Material de procesado y análisis. Cuando los mosquitos llegan del campo, estos se encuentran congelados y confinados en bolsas, recipientes o redes (Figura 18). Los mosquitos se transfieren a placa de Petri o viales similares (Figura 19). Podemos colocar una hoja papel de filtro bajo la placa de Petri para poder recoger todo el contenido de la red. Este proceso se debe realizar lo más rápido posible con el fin de que el material biológico permanezca a T^a ambiente el menor tiempo posible. Es necesario disponer de un mínimo de material de laboratorio para realizar en condiciones óptimas el procesado y manipulación de los mosquitos. Necesitaremos varios modelos de pinzas, de punta fina y punta roma, placas de Petri y rotuladores permanentes.



Figura 18. Mosquitos recolectados en redes.



Figura 19. Contenido de insectos vertido sobre una hoja de papel de filtro para su trasvase a placas de Petri.

Cadena de frío. La cadena de frío debe mantenerse durante la identificación de los mosquitos y para ello es necesario disponer de una base que se mantenga fría durante un tiempo. Podemos usar mesas frías (*chill table*) o placas-bandejas de enfriamiento (Figura 20) que permiten mantener una superficie plana por debajo de 0°C. Como alternativas más baratas se puede utilizar una caja llena de hielo picado o acumuladores de frío procedentes del crió congelador (-80° C) o congelador (-20° C) (Figura 20). La opción más profesional es la mesa fría, pero además de ser una opción costosa, requiere que el soporte de la lupa binocular tenga un soporte de altura suficiente para permitir el enfoque



de la muestra al colocarla entre la base y el objetivo de la lupa binocular, es ruidoso, evacua aire caliente por los laterales y puede generar gotas de humedad, por lo que es más común el uso de las otras alternativas mencionadas más económicas.



Figura 20. Trabajo sobre bandeja de poliespán con hielo picado. Sobre esta base se coloca una placa de Petri con los mosquitos a identificar y en los laterales se sitúan viales Eppendorf con los mosquitos ya identificados.

Cribado de insectos. Dependiendo del tipo de trampa utilizada, la localización y periodo muestreo, pueden aparecer recolectas con una gran diversidad y abundancia de insectos. Por ejemplo, las trampas CDC con luz atraen de manera inespecífica y generalista a cualquier insecto con atracción por la luz (e.j. polillas, escarabajos, etc.), de este modo nuestras bolsas de recolección pueden estar llenas de insectos que no son de interés para la vigilancia del VNO, lo cual además generará un mayor de tiempo de análisis. El empleo de trampas sin luz y con fuente de CO₂ suele generar recolectas donde en su mayoría los insectos atraídos son hematófagos, y por ende con interés sanitario. Además de mosquitos, se pueden capturar números elevados de flebotomos, *Culicoides*, o simúlidos (Figura 21).



Figura 21. Ejemplos de capturas de trampas BG-Sentinel cebadas con hielo seco con un gran número de insectos hematófagos no diana para detección de virus del Nilo Occidental. A la izquierda, ejemplo de captura de flebotomos (transmisores de la Leishmania), en el centro una placa con mosquitos y a la derecha de jejenes de tipo *Leptoconops*.

Identificación. Para la identificación morfológica de los mosquitos deben emplearse claves de determinación en inglés. En el momento de redactar este informe no está disponible ninguna clave en español. Actualmente se dispone básicamente de dos posibilidades:

- Programa informático MosKeyTool (Gunay et al. 2018)
- Clave taxonómica de Becker et al. (2020)

De cada ejemplar capturado, se determina el sexo y la especie. Posteriormente, para el análisis virológico, teniendo en cuenta criterios económicos y entomológicos, se seleccionan las cuatro especies de mosquitos que en nuestro país son los principales vectores del virus del Nilo (Vogert 2007, Figuerola et al. 2022 y datos inéditos): *Culex pipiens*, *Culex perexiguus*, *Culex modestus* y *Culex laticinctus*.

Las hembras con sangre se separan para determinar sobre que especie de vertebrado se han alimentado mediante la amplificación y secuenciación de un fragmento del gen COI de los vertebrados (Muñoz et al. 2012).

Realización de lotes para análisis. Los ejemplares del mismo sexo y especie capturados en la misma fecha y localidad se agrupan en lotes de hasta 50 individuos. Cada lote se almacena en un tubo eppendorf libre de RNAsas (RNase-free tubes) de 1,5 ml de volumen. Es importante que estos tubos estén libres de RNAsas porque en ellos se iniciará el proceso de extracción de los ácidos nucleicos y la presencia de RNAsas puede degradar el RNA del virus. Durante su manipulación, tanto las muestras pendientes de clasificación como los tubos eppendorfs con los lotes ya identificados se mantienen en una caja de poliespán con hielo picado para mantener la cadena de frío. Alternativamente se pueden utilizar acumuladores de frío para mantener las muestras refrigeradas. Una vez identificados, los lotes con los mosquitos se almacenan a -80°C hasta el momento de su análisis molecular.



Estimación de capturas de gran abundancia. En ocasiones, las capturas de las trampas pueden tornarse muy elevadas (varios miles). En estos casos, es recomendable realizar una estimación de las capturas, a fin de agilizar el conteo e identificación de mosquitos. Se considera que está justificado el uso de la balanza de precisión cuando las capturas superen los 0.7 g de contenido en mosquitos (en torno a 400-800 mosquitos, dependiendo de la especie predominante). Previo al procesado, se deben eliminar manualmente los “otros insectos” que estén presentes en la muestra (en la medida de lo posible).

A continuación, se colocarán los mosquitos en una (o varias) placas de Petri y se utilizará una balanza de precisión (con una resolución de al menos 0.001gr) para determinar el peso total de la muestra. En otra placa Petri colocaremos los mosquitos que se van a identificar que debe alcanzar una cifra mínima de 400-600 ejemplares para que la extrapolación tenga un bajo margen de error. Para ello llenamos la placa Petri (la que se va a identificar) con entre 0,7g y 1.5 g de mosquitos, dependiendo de la especie mayoritaria de la red: los *Cx. perexiguus* y *Cx. modestus* son de pequeño tamaño por lo que entre 0.7 y 0.9 g es suficiente para llegar al nº de ejemplares ideal en la placa. En caso de que nuestras capturas sean predominantes otros mosquitos de mayor tamaño (e.j. *Culex theileri* u otras especies), será necesario colocar en la placa a identificar entre 1 y 1.5 g para alcanzar el nº de ejemplares necesario.



Figura 22. A la izquierda, cada red contiene las capturas de 24 h de una sola trampa Bg-Sentinel cebada con CO₂ con varios miles de mosquitos cada una. A la derecha, el contenido de una sola de las redes separada en placas de Petri con entre 11 y 13 g de mosquitos cada una. La marcada con la flecha roja es la que se identificará a nivel de especie, inicialmente con aproximadamente 1.2 g de mosquitos, lo que supone unos 400 - 600 mosquitos.

Una vez preparada la placa con los ejemplares que deben ser identificados pasamos a preparar los restos, para ello taramos otra placa Petri o un recipiente donde se quieran



guardar y echamos los mosquitos restantes que queden en la red y apuntamos los pesos y toda la información de la red (fecha, lugar, etc.). El resto de los mosquitos que no se van a identificar se preservarán inmediatamente a -80°C (Figura 22).

Para realizar la extrapolación hacemos una regla de 3:

(a) Mosquitos identificados (gr) ▼ (b) N° de mosquitos identificados.
(c) Resto de mosquitos guardados (gr) → (x) N° total de mosquitos en los restos.

$$x = \frac{c \times b}{a}$$

Si queremos saber el número de mosquitos de cada especie que tenemos en los restos repetiremos la fórmula, pero con el número de mosquitos por especie.

5. ANÁLISIS MOLECULAR PARA LA IDENTIFICACIÓN DEL VIRUS DEL NILO OCCIDENTAL

Es recomendable, previo al inicio de las capturas, comprobar que se dispone de material y reactivos suficientes para la realización de los análisis con el fin de evitar retrasos.

El trabajo de extracción se realizará en cabina de seguridad biológica, en un laboratorio de bioseguridad P2 o P3, evitando que se generen aerosoles durante el proceso.

- **Homogenización en MEM:** Antes de extraer el ARN los lotes de mosquitos se tienen que homogeneizar en MEM (medio esencial mínimo) estéril y suplementado con 10% de Suero Fetal Bovino, 0.5% de penicilina y estreptomina y 10% de L-Glutamina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, Estados Unidos). La cantidad de MEM a utilizar depende de los mosquitos introducidos en el lote. Los lotes de menos de 30 mosquitos se homogenizan en 500 μl de MEM, mientras que los lotes de 30 a 50 mosquitos se homogenizan en 700 μl . El proceso de homogeneización se puede realizar de manera manual con un agitador de pistilo (lote por lote), o por grupos de lotes utilizando perlas de acero inoxidable de 5 mm en un equipo automático (conocidos como Tissue Lyser) que utiliza agitación a alta velocidad para romper los tejidos.

En ambos casos, es importante que no se rompa la cadena de frío y los mosquitos sigan congelados hasta que se homogenizan y luego sigan en frío hasta que empiece la extracción de ARN. Una vez que el tejido está homogeneizado, los lotes se centrifugarán a 13,000 rpm a 4°C durante 5 min. De los lotes de mosquitos homogeneizados en MEM, se tomará una alícuota del sobrenadante para la extracción de RNA y el resto se guardará inmediatamente a -80°C para intentar el cultivo celular (requiere laboratorio de bioseguridad P3) y análisis genómico en caso de PCR positiva.



- **Extracción de ARN:** En este caso la extracción de ARN viral se realiza con kits comerciales. Se recomienda el uso del kit QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA, Estados Unidos) o el Maxwell 16 Viral Total Nucleic Acid Purification Kit (Promega) usando un robot de extracción automático. Ambos kits han demostrado un elevado y contrastado nivel de eficacia en los ensayos realizados en la EBD-CSIC e ISC III obteniéndose ciclos de amplificación muy similares al analizar la misma muestra con ambos kits. Los protocolos específicos pueden consultarse en el Apéndice 1.
- **Detección de virus del Nilo Occidental mediante qRT-PCR:** La presencia del virus del Nilo Occidental se detecta de forma directa usando una qRT-PCR (PCR en tiempo real con transcripción reversa en un paso). En esta PCR se detecta la secuencia conservada de la región 3'-UTR del genoma del VNO y se usa un control interno para evitar falsos negativos. La PCR se hace siguiendo a Vázquez et al. (2016) aunque existen otros métodos utilizados en distintos laboratorios europeos. En cualquier caso es recomendable el uso de un protocolo que permita la detección de cualquier linaje del VNO, debido a la situación epidemiológica en nuestro país, con circulación de VNO de los linajes 1 y 2 y la detección ya hace unos años de un tercer linaje (Vázquez et al. 2010, Busquets et al. 2019, Ruiz-López et al. 2023, Aguilera-Sepúlveda et al. 2024). El protocolo de qPCR que se describe a continuación está optimizado para trabajar en los termocicladores LightCycler 480 (ROCHE, Basel, Switzerland) y 7500 Fast (Applied Biosystems, Waltham, MA, USA) y el kit Quantitec Multiplex RT-PCR de Qiagen (ref 204643). Durante la puesta a punto de la PCR se han probado diferentes kits de PCR y este es el que tiene mayor sensibilidad. La PCR se hace utilizando los primers WNTR-F 5'- CGGAAGTYGRGTAKACGGTGCTG 3', y WNTR-Re 5' CGGTWYTGAGGGCTTACRTGG 3'. Además, la PCR utiliza un control interno para asegurar que la PCR funciona bien. La detección se hace con dos sondas, una para VNO (SONDA WNV (FAM): WCCCCAGGWGGACTG-NFQ-MGB con una absorbancia de 465/510) y otra para el Control Interno (SONDA CI (NED): CCAGCACACATGTGTCTACT-MGB-NFQ con una absorbancia de 533/580). Se preparan 20 ml de master mix de PCR y se añaden 5 ml de muestra. Todas las RT-qPCR tienen que tener un control negativo y un control positivo. Las condiciones para la preparación de la master mix para la RT-qPCR se describen en el Apéndice 1. La sensibilidad media del método utilizando los reactivos indicados es de 5 copias virales por reacción (Vázquez et al. 2016), cualquier cambio en los reactivos descritos debería validarse para verificar que se mantienen los niveles de sensibilidad del análisis.
- **Detección de Virus del Nilo Occidental usando una RT-PCR anidada convencional.** Aunque con menos sensibilidad el VNO también se puede detectar utilizando una RT-PCR convencional. Sin embargo, la sensibilidad de esta PCR convencional es muy inferior a la RT-qPCR. Por ejemplo, al analizar con ambos métodos 419 lotes de mosquitos capturados durante el brote de VNO en Andalucía, con la RT-qPCR específica para VNO se detectaron 34 lotes positivos, mientras que con la RT-PCR genérica para flavivirus solo se detectaron 20 de estos lotes (Figuerola et al. 2022). En nuestro caso hemos utilizado una RT-PCR



en dos pasos (anidada), con un primer paso de retro-transcripción donde se amplifica un fragmento de 1385 pb y otro paso de PCR en el que se amplifica el cDNA generado en el primer paso. Posteriormente, mediante una PCR anidada, se amplifica un fragmento de 143 pb (según el método descrito en Sánchez-Seco et al. 2005). Estos dos pasos se hacen en reacciones separadas. Esta PCR no es específica para el VNO y amplifica también otros flavivirus por lo que la positividad de las muestras se confirma haciendo secuenciación SANGER de los productos generados.

Para hacer esta PCR se usa el kit Qiagen OneStep RT (Qiagen). Y los primers FLAVI 1 + (5'GA(TC)(TC)TIGGITG(TC)GGIIGIGGI(GA)GITGG)3' y FLAVI 1-(5'TCCCAICCI(GA)T(GA)TC(GA)TCIGC3'). Estos primers amplifican un fragmento de 1385 pb. Hay que tener en cuenta además que estos primers se degradan muy fácilmente debido a su secuencia. Por tanto, es mejor hacer alícuotas de 40 µl con el fin de evitar procesos de descongelación-congelación que favorezcan la degradación. La composición de la master mix se muestra en el Apéndice 1. En cada reacción se reparte 22.5 µl de master mix, y 2.5 µl de ARN extraído. En todas las PCRs se incluirá un control negativo y un control positivo. La PCR se realizará usando el siguiente programa: 45°C durante 30 min, 94°C durante 15 min, 40 ciclos a 94°C durante 30 seg, 40°C durante 4 minutos y 72°C durante 90 segundos. Se acabará con un último ciclo de amplificación a 72°C durante 5 minutos y dejando el termociclador a 4°C hasta que se saque del termociclador la PCR. Este proceso dura 5 h 15 m 35s. El producto de la PCR anidada se visualizará corriéndolo en un gel de agarosa al 2%. Las condiciones de voltaje y tiempo para correr este gel dependen del tamaño de gel y la máquina de electroforesis, pero es importante dejar correr el gel suficiente tiempo para que las bandas se separen adecuadamente. Si se corren varias filas en el gel, todas tienen que tener un pocillo con el control positivo para comprobar el tamaño de la banda. Las muestras positivas deben ser secuenciadas utilizando tecnología SANGER para confirmar que se trata del VNO y no de cualquier otro flavivirus.

Debido a su mayor rapidez, sensibilidad y especificidad es recomendable el uso de técnicas RT-qPCR en los programas de vigilancia. Cualquier variación en los reactivos utilizados es recomendable que sea validado con muestras control positivas para garantizar que no afecta negativamente a la sensibilidad de la técnica.

6. Validación y comunicación de los resultados

Para reducir el riesgo de obtener falsos positivos, las muestras positivas se mandan al Laboratorio de Arbovirosis del Centro Nacional de Microbiología del Instituto de Salud Carlos III para su confirmación (Figura 23). En cada muestra positiva se envía tanto el extracto como la muestra en MEM. De esta manera se puede repetir todo el proceso de extracción y en el caso de ser la muestra positiva se puede iniciar el cultivo y secuenciación genómica de los virus en condiciones de BSL3. La información sobre la especie, fecha y lugar de captura de las muestras positivas se comunican de manera inmediata al Centro de Coordinación de Alertas y Alarmas Sanitarias y a la Consejería de Salud y Familias de la Junta de Andalucía.

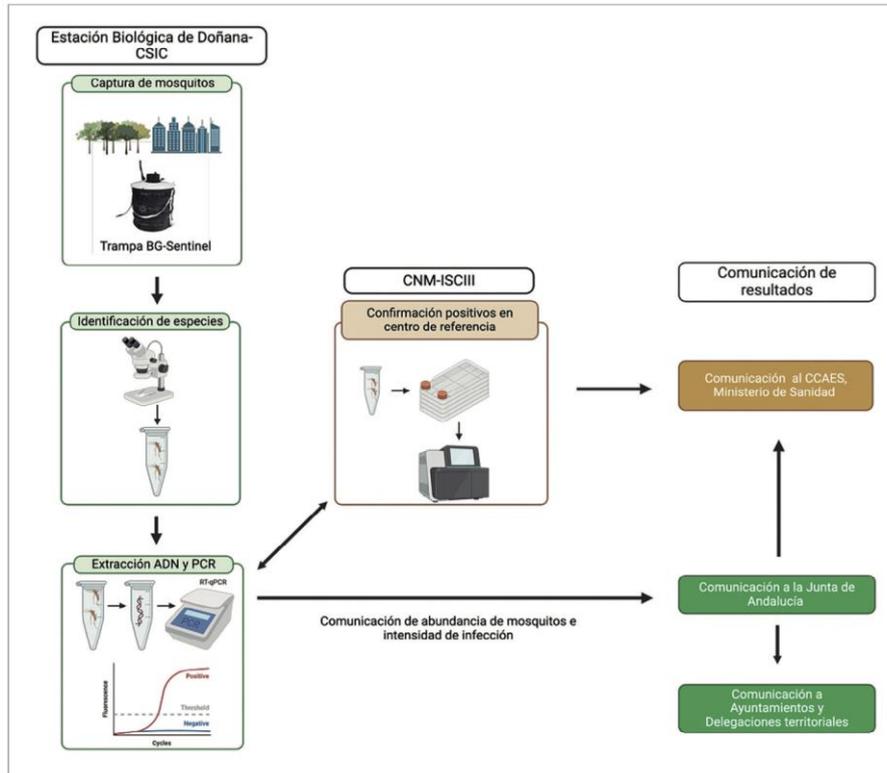


Figura 23. Representación esquemática del funcionamiento de los análisis y comunicación de los resultados a las autoridades competentes.

7. Errores comunes que reducen la efectividad del programa de vigilancia entomo-virológica

1. **No utilizar hielo seco o CO₂ para aumentar las capturas:** A menudo se justifica no usar estos atrayentes debido a su coste económico o problemas logísticos, pero es importante tener en cuenta que lo caro es financiar todo el esfuerzo de personal para la colocación y recogida de las trampas y la identificación y análisis de los mosquitos. El coste del CO₂ es poco importante en comparación con estos otros costes y aumenta de manera muy significativa las capturas. Para detectar la circulación del virus del Nilo Occidental antes de que se produzcan casos en humanos es necesario analizar miles de mosquitos. Por lo tanto, es importante disponer de un número elevado de mosquitos para analizar y esto solo es posible utilizando este tipo de atrayentes.
2. **Falta de conservación en frío de los mosquitos:** Este es uno de los errores más frecuentes, generalmente debido a dificultades logísticas. Es crucial mantener la cadena de frío desde el momento de la recolección de los mosquitos hasta su procesamiento para garantizar la viabilidad del material biológico.
3. **Uso de mosquitos que llevan más de 24 horas muertos:** Dejar las trampas operativas durante varios días, especialmente en estaciones conectadas a la red eléctrica, puede resultar en la acumulación de mosquitos no aptos para el análisis. Solo los ejemplares vivos o los que hayan muerto pocas horas antes de la recolección son válidos para la vigilancia virológica. Los mosquitos en estado



avanzado de descomposición no deben ser empleados en el análisis, ya que comprometen los resultados.

4. **Clasificación incorrecta de los mosquitos:** Por falta de dispositivos ópticos adecuados, limitaciones de tiempo o desconocimiento, a veces no se identifica correctamente el material capturado. Esto lleva a analizar lotes de mosquitos mezclados con otros insectos, lo que puede producir resultados poco fiables y científicamente cuestionables.
5. **Almacenamiento en alcohol:** En ocasiones los mosquitos se almacenan en soluciones de etanol. Esto dificulta su identificación a nivel específico y puede reducir la sensibilidad del análisis virológico.
6. **No utilizar controles negativos de extracción:** Para reducir el riesgo de falsos positivos y poder detectar casos de contaminación de los reactivos, equipos o instalaciones es importante incluir controles negativos desde el momento de la extracción.
7. **Uso de métodos de extracción poco eficientes:** La extracción del material genético debe realizarse con protocolos optimizados. La falta de eficiencia en este proceso puede reducir significativamente el rendimiento y la calidad de los análisis virológicos.
8. **Uso de retro-transcriptasas de baja calidad:** El éxito del análisis virológico depende del uso de reactivos de biología molecular de alta calidad, especialmente retro-transcriptasas eficientes, que son clave para obtener resultados precisos y reproducibles.
9. **Falta de controles positivos del virus del Nilo Occidental:** Este punto es especialmente importante para validar la calidad de los resultados y evitar falsos resultados negativos. Distintas empresas distribuyen controles positivos para su uso en laboratorio.

Estos errores reducen la sensibilidad y efectividad de la técnica de RT-qPCR, dificultando la detección del virus, es decir aumentando los falsos negativos. Esto es especialmente relevante durante las fases iniciales de la temporada de transmisión, cuando la intensidad de circulación del VNO es aún baja. El deterioro del ARN o los problemas en el proceso de análisis pueden reducir la capacidad para detectar muestras positivas, puede retrasar la detección de las primeras muestras positivas, comprometiendo el objetivo principal: identificar la circulación viral con semanas de antelación a los primeros casos en humanos.



8. Bibliografía

Aguilera-Sepúlveda P, Cano-Gómez C, Villalba R, Borges V, Agüero M, Bravo-Barriga D, Frontera E, Jiménez-Clavero MA, Fernández-Pinero J (2024) The key role of Spain in the traffic of West Nile virus lineage 1 strains between Europe and Africa, *Infectious Diseases*, 56:9, 743-758. <https://doi.org/10.1080/23744235.2024.2348633>

Becker N, Petrić D, Zgomba M, Boase C, Madon M (2020) *Mosquitoes: Identification, ecology and control*. Springer Nature.

Busquets N, Laranjo-González M, Soler M, Nicolás O, Rivas R, Talavera S, Villalba R, San Miguel E, Torner N, Aranda C, Napp S (2019) Detection of West Nile virus lineage 2 in North-Eastern Spain (Catalonia). *Transbound Emerg Dis*. 66:617-621. <https://doi.org/10.1111/tbed.13086>

Engler O, Savini G, Papa A, Figuerola J, Groschup MH, Kampen H, Medlock J, Vaux A, Wilson AJ, Werner D, Jöst H, Goffredo M, Capelli G, Federici V, Tonolla M, Patocchi N, Flacio E, Portmann J, Rossi-Pedruzzi A, Mourelatos S, Ruiz S, Vázquez A, Calzolari M, Bonilauri P, Dottori M, Schaffner F, Mathis A, Johnson N (2013) European Surveillance for West Nile Virus in Mosquito Populations. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 2013, 10, 4869-4895. <https://doi.org/10.3390/ijerph10104869>

Ferraguti M, Martínez-de la Puente J, Roiz D, Ruiz S, Soriguer R, Figuerola J (2016) Effects of landscape anthropization on mosquito community composition and abundance. *Sci Rep* 6, 29002. <https://doi.org/10.1038/srep29002>

Figuerola J, Jiménez-Clavero MÁ, Ruíz-López MJ, Llorente F, Ruiz S, Hofer A, Aguilera-Sepúlveda P, Jiménez-Peñuela J, García-Ruiz O, Herrero L, Soriguer RC, Fernández Delgado R, Sánchez-Seco MP, Martínez-de la Puente J, Vázquez A (2022) A One Health view of the West Nile virus outbreak in Andalusia (Spain) in 2020. *Emerg Microbes Infect.* 11(1):2570-2578. <https://doi.org/10.1080/22221751.2022.2134055>

Gunay F, Picard M, Robert V (2018) MosKeyTool, an interactive identification key for mosquitoes of Euro-Mediterranean. Version 2.1. Disponible en www.medilabsecure.com/moskeytool

Muñoz J, Ruiz S, Soriguer R, Alcaide M, Viana DS, Roiz D, Vázquez A, Figuerola J (2012) Feeding Patterns of Potential West Nile Virus Vectors in South-West Spain. *PLoS ONE* 7(6): e39549. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0039549>

Rizzoli A, Jiménez-Clavero MA, Barzon L, Cordioli P, Figuerola J, Koraka P, Martina B, Moreno A, Nowotny N, Pardigon N, Sanders N, Ulbert S, Tenorio A (2015) The challenge of West Nile virus in Europe: knowledge gaps and research priorities. *Eurosurveillance* 20: 21135. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES2015.20.20.21135>



Roiz D, Roussel M, Muñoz J, Ruiz S, Soriguer R, Figuerola J (2012) Efficacy of Mosquito Traps for Collecting Potential West Nile Mosquito Vectors in a Natural Mediterranean Wetland. *Am J Trop Med Hyg* 86:642-648.

<https://doi.org/10.4269/ajtmh.2012.11-0326>

Roiz D, Ruiz S, Soriguer R, Figuerola J (2015) Landscape Effects on the Presence, Abundance and Diversity of Mosquitoes in Mediterranean Wetlands. *PLoS ONE* 10(6): e0128112. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0128112>

Ruiz-López MJ, Aguilera-Sepúlveda P, Cebrián-Camisón S, Figuerola J, Magallanes S, Varona S, Cuesta I, Cano-Gómez C, Sánchez-Mora P, Camacho J, Sánchez-Peña C, Marchena FJ, Ameyugo U, Ruiz S, Sanchez-Seco MP, Agüero M, Jiménez-Clavero MA, Fernández-Pinero J, Vázquez A. (2023) Re-Emergence of a West Nile Virus (WNV) Variant in South Spain with Rapid Spread Capacity. *Viruses* 15:2372.

<https://doi.org/10.3390/v15122372>

Sánchez-Seco MP, Rosario D, Domingo C, Hernández L, Valdés K, Guzmán MG, Tenorio A (2005) Generic RT-nested-PCR for detection of flaviviruses using degenerated primers and internal control followed by sequencing for specific identification. *J Virol Methods* 126:101–109.

<https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2005.01.025>

Vázquez A, Herrero L, Negredo A, Hernández L, Sánchez-Seco MP, Tenorio A (2016) Real Time PCR Assay for Detection of All Known Lineages of West Nile Virus. *J Virol Methods* 236:266–270. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2016.07.026>

Vázquez A., Sánchez-Seco MP, Ruiz S, Molero F, Hernández L, Moreno J, Magallanes A, Gómez Tejedor C, Tenorio A (2010) Putative new lineage of West Nile virus, Spain. *Emerg Infect Dis.* 16:549-552. <https://doi.org/10.3201/eid1603.091033>



Apéndice 1. Protocolo detallado para los análisis moleculares.

Antes de empezar:

Recordad disponer de todo el material necesario, e.j. puntas de pipeta de los tamaños deseados autoclavados, agua autoclavada, lancetas autoclavadas, viales autoclavados, etc.

Extracción con Kit de Qiagen

- Recordar que el buffer AVL se conserva a 4°C pero tiene que estar a temperatura ambiente antes de su uso (cuando desaparezcan los cristales). Los otros buffers se conservan a temperatura ambiente y se reconstituyen con etanol absoluto (ver protocolo del kit).

- Los eppendorfs de 1.5ml tienen que rotularse claramente con el número de muestra. Si se rompe algún tapón con el sobrenadante hay que pasarlo a otro tubo.

- Añadir a cada tanda de extracciones un control negativo.

- Dada la inestabilidad del ARN, es recomendable que no pasen más de 2 semanas entre el almacenamiento en MEM y la extracción, y la extracción y la PCR. También es recomendable no congelar y descongelar el homogenizado ni la extracción.

Protocolo de extracción:

1. Añadir 560 µl de AVL (ya reconstituido) en tubos estériles de tapón de rosca y rotularlos.
2. Alícuota 140 µl del sobrenadante y depositarlo en los tubos rotulados con AVL. Esta mezcla se puede congelar a -20°C. (No almacenar durante más de 2 semanas).
3. Atemperar las muestras (mosquitos + AVL) y añadir 560 µl de Etanol absoluto.
4. Mezclar bien agitando de arriba abajo (no usar vórtex); y dar un pulso (llevar a 12.000 g).
5. Añadir 630 µl de la mezcla a las columnas respectivas (rotuladas en la tapa).
6. Centrifugar a 16.000 g durante 1 minuto en centrífuga a 22° C.
7. Eliminar el filtrado (tirar el líquido y volver a colocar el tubo).
8. Añadir otros 630µl de la mezcla (el resto) a las columnas correspondientes (No coger debris).
9. Centrifugar a 16.000 g durante 1 minuto a 22° C.
10. Cambiar de tubo inferior y añadir 500µl de buffer AW1 (agitar antes de usar).
11. Centrifugar a 16.000 g durante 1 minuto.
12. Eliminar el filtrado y añadir 500 µl de buffer AW2 (agitar antes de usar).
13. Centrifugar a 16.000 g durante 5 minutos. (Tubos con rabito hacia el interior).



Mientras tanto rotular nuevos tubos eppendorf de 1,5 ml de tapa clip estériles.

14. Volver a centrifugar las columnas a 16.000 g durante 2 minutos con giro de tubos.
15. Comprobar que esté seco el filtro (que no se vea ninguna gota, si no es así volver a centrifugar).
16. Colocar las columnas en los eppendorf de 1,5 ml y añadir 60 µl de AVL.
17. Incubar 1 minuto a temperatura ambiente.
18. Centrifugar a 16.000 g durante 2 minutos con las tapas de los eppendorf hacia el centro.
19. Sacar la columna del eppendorf y tirarla. El resultado del filtrado es el extracto de la muestra.
18. Almacenar a -80°C .

Extracción con robot Maxwell

1. Preparar en un eppendorf nuevo y rotulado con el nombre de la muestra la solución de lisis: 20 µl Proteínasa K + 200 µl Buffer de lisis por cada muestra
2. Extraer 150 µl del sobrenadante y depositarlo en los tubos con la solución de lisis mezclando bien con la punta de la pipeta.
3. Poner en el Termoblock a 56°C durante 10 minutos (muestras y controles).
4. Encender la máquina de extracción Maxwell 16 y programar: RUN + Prog. Ac Nucleico Viral
5. Sacar la plataforma de Maxwell 16 y meterla en la cabina y colocar los cartuchos en la misma.
6. Rotular los tubos de elución de 0.5ml con el nombre de cada muestra y colocarlos en los pocillos numerados de la plataforma.
7. Añadir 50 µl de agua libre de nucleasas a los tubos de elución (dejar el tapón cerrado).
8. Abrir los cartuchos con cuidado de que no caigan restos del envoltorio que los cubren en los pocillos ni quede ningún resto pegado. Cuando se utilizan menos de 16 cartuchos, centrarlos en la plataforma o colocarlos equitativamente.
9. Sacamos los lotes de mosquitos y controles del termoblock, tomamos los 370 µl de los mismos y los transferimos al pocillo 1 de cada cartucho (el pocillo más alejado de los tubos).



10. Colocar los émbolos en el pocillo nº 8 de cada cartucho (el último pocillo junto a los pocillos numerados de la plataforma).
11. Finalmente, abrir los tubos de elución y colocar la plataforma en la máquina Maxwell 16 para su extracción.
12. Una vez que la Maxwell 16 ha terminado (43 min. aprox.), cerrar los tubos de elución y conservarlos a -80°C hasta que se realice la PCR.

Condiciones de master mix de la qRT-PCR

MIX para qRT PCR	x1
AGUA	2,8 µl
2x Quantitec RT-PCR Master	12,5 µl
WNT RF (100ml)	0,2 µl
WNTR-Re (100ml)	0,2 µl
Sonda WN-Fam 5mM	2 µl
Sonda CINED 10mM	1 µl
CI 10⁸	1 µl
RT Mix Quantite Multiplex	0,3 µl
VOLUMEN TOTAL / DISPENSAR	20 µl
ARN y CTLs	5 µl

La qRT-PCR se corre usando el siguiente programa: Fase 1, Retrotranscripción, a 50°C 30 minutos. Fase 2: PCR, a 95°C 15 min, a 94°C 45 seg, a 60°C 60 segundos. La Fase 2 se repite durante 45 ciclos. Una vez completada la segunda fase se analiza la PCR siguiendo el protocolo marcado por el termociclador para calcular el Ct. Cts, mayores de 40 se consideran negativos y menores de 40 positivos.

Composición de master mix de RT-PCR flavivirus

REACTIVOS <u>PCR 1 ARN</u>	x1/µl
Agua libre de RNAsas	15.1µl



5x QIAGEN OneStep RT-PCR Buffer	5 μ l
DNTPs 10Mm	1 μ l
FLAVI 1+ (100pmol/μl o 100Um)	0.2 μ l
FLAVI 1- (100pmol/μl o 100Um)	0.2 μ l
QIAGEN OneStep RT-PCR Enzyme Mix	1 μ l
VOLUMEN FINAL	22.5 μ l

Composición Master Mix PCR anidada

REACTIVOS 2 PCR ARN	x1/ μ l
Agua libre de RNAsas	11.1 μ l
Perpetual Taq PCR MasterMix (2x)	12.5 μ l
FLAVI 2+ (100pmol/μl o 100Um)	0.2 μ l
FLAVI 2- (100pmol/μl o 100Um)	0.2 μ l
10X COLOR LOAD (opcional)	
VOLUMEN FINAL	24 μ l