

**EFFECTO DE LA COMPOSICIÓN BACTERIANA EN EL INTESTINO MEDIO EN
LAS CEPAS DE *Aedes aegypti* SUSCEPTIBLE Y REFRACTARIA AL VIRUS
DENGUE**

LIZETH VIVIANA ROMERO VALENCIA

**UNIVERSIDAD ICESI
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS QUÍMICAS
PROGRAMA DE QUÍMICA FARMACÉUTICA
SANTIAGO DE CALI
2014**

**EFFECTO DE LA COMPOSICIÓN BACTERIANA EN EL INTESTINO MEDIO EN
LAS CEPAS DE *Aedes aegypti* SUSCEPTIBLE Y REFRACTARIA AL VIRUS
DENGUE**

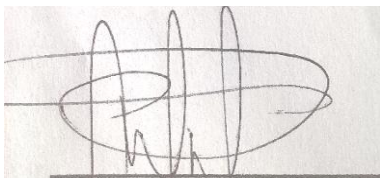
LIZETH VIVIANA ROMERO VALENCIA

Trabajo de grado para optar al título de Químico Farmacéutico

**DIRECTOR
CLARA BEATRIZ OCAMPO DURÁN**

**UNIVERSIDAD ICESI
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS QUÍMICAS
PROGRAMA DE QUÍMICA FARMACÉUTICA
SANTIAGO DE CALI
2014**

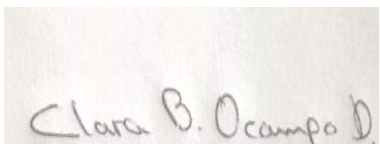
APROBADO POR:



(Nombre Correspondiente)
Evaluador Externo.

Marcela Santibella T.

(Nombre Correspondiente)
Evaluador Externo.



(Nombre Correspondiente)
Director del Proyecto.

(Nombre Correspondiente)
Director ó Co-Director del Proyecto.

DEDICATORIA

Se dedica este trabajo al departamento de control de vectores de CIDEIM para que por medio de este aporte, se continúe indagando sobre el efecto de la composición bacteriana en la respuesta inmune del mosquito y de esta manera, se pueda aportar conocimiento sobre nuevas estrategias de control y así disminuir el gran problema de salud pública que se ha generado a causa del dengue.

AGRADECIMIENTOS

- A Dios, que ha permitido el desarrollo del proyecto y ha sido participe del mismo, me ha guiado y brindado la paciencia, la sabiduría y la fortaleza para enfrentar cada uno de los obstáculos que se han presentado.
- A la Universidad Icesi, por brindarme los conocimientos y las herramientas para formarme cada día como persona y como profesional.
- A las personas de CIDEIM, especialmente a la comunidad de control de vectores, por abrirme las puertas y acompañarme en el proceso de entrenamiento y la parte experimental.
- A mi familia por la fuerza y el apoyo que me brindan.
- A mi directora de trabajo de grado Clara Beatriz Ocampo por su acompañamiento, orientación y empeño.

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	2
1. INTRODUCCIÓN	3
2. DESCRIPCIÓN DEL TRABAJO.....	5
2.1 PLANTEAMIENTO Y JUSTIFICACIÓN DEL PROBLEMA.....	5
3. MARCO DE REFERENCIA.....	7
3.1 DENGUE.....	7
3.2 EPIDEMIOLOGÍA DEL DENGUE.....	7
3.3 SINTOMATOLOGÍA	8
3.4 CONCEPTOS GENERALES ACERCA DEL VIRUS.....	8
3.5 VECTOR(ES) DEL DENGUE	8
3.6 ¿EXISTE ALGÚN TIPO DE TRATAMIENTO? ¿CÓMO SE CONTROLA?	9
3.7 ¿QUÉ ES COMPETENCIA VECTORIAL Y QUE SE HA LOGRADO INVESTIGAR?.....	10
3.8 ¿CÓMO SE DETECTA SI EL MOSQUITO ESTÁ INFECTADO?	11

3.9 ¿QUÉ SE HA LOGRADO ESTUDIAR SOBRE COMPOSICIÓN BACTERIANA?.....	12
4. OBJETIVOS.....	14
4.1 OBJETIVO GENERAL	14
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	14
5. METODOLOGÍA	15
5.1 MANTENIMIENTO DE MOSQUITOS DEL LABORATORIO.....	15
5.2 VERIFICACIÓN DE LAS CONDICIONES DEL MEDIO AMBIENTE PARA LA POSTERIOR DETECCIÓN DE BACTERIAS.....	15
5.3 EVALUACIÓN DE LA EXISTENCIA DE BACTERIAS PRESENTES EN EL INTESTINO MEDIO DE <i>Aedes aegypti</i> DE LAS CEPAS SUSCEPTIBLE Y REFRACTARIA AL VIRUS DENGUE	16
5.4 ESTANDARIZACIÓN DEL ANTIBIÓTICO.....	16
5.5 DETERMINACIÓN DEL CRECIMIENTO DE LEVADURAS.....	18
5.6 IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE BACTERIAS.....	18
5.7 EXTRACCIÓN DE ADN, PCR Y SECUENCIACIÓN.....	19
5.9 ANÁLISIS DE SECUENCIA	22
5.10 MANTENIMIENTO DEL VIRUS E INFECCIÓN DE MOSQUITOS.....	22

5.11DETECCIÓN DEL VIRUS Y MEDICIÓN DE LA COMPETENCIA VECTORIAL.....	23
6. RESULTADOS.....	24
6.1 VERIFICACIÓN DE LAS CONDICIONES DEL MEDIO AMBIENTE PARA LA POSTERIOR DETECCIÓN DE BACTERIAS.....	24
6.2 EVALUACIÓN DE LA EXISTENCIA DE BACTERIAS PRESENTES EN EL INTESTINO MEDIO DE <i>Aedes aegypti</i> DE LAS CEPAS SUSCEPTIBLE Y REFRACTARIA AL VIRUS DENGUE	24
6.3 ESTANDARIZACIÓN DEL ANTIBIÓTICO.....	27
6.4DETERMINACIÓN DEL CRECIMIENTO DE LEVADURAS.....	29
6.5IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE BACTERIAS.....	29
6.6 MEDICIÓN DE LA COMPETENCIA VECTORIAL.....	33
7. ANÁLISIS DE RESULTADOS.....	35
8. CONCLUSIONES	38
9. RECOMENDACIONES.....	39
10. BIBLIOGRAFÍA	40
11. ANEXOS.....	44

LISTADO DE TABLAS

Tabla 1. Mix para la PCR.....	21
Tabla 2. Ciclo térmico de la PCR.....	21
Tabla 3. Longevidad frente al tratamiento con penicilina-estreptomicina-gentamicina.....	27
Tabla 4. Longevidad frente al tratamiento con metronidazol	28
Tabla 5. Resultados del MALDITOF	31
Tabla 6. Cuantificación del ADN (NANODROP)	32
Tabla 7. Resultados de secuenciación (BLAST).....	32

LISTADO DE FIGURAS

Figura. 1 Imagen de inmunofluorescencia indirecta (IFI)	12
Figura. 2 Visualización del proceso de disección.....	18
Figura. 3. Alimentación de mosquitos con sangre + virus	23
Figura. 4. Primeras diluciones y tipos de bacterias identificada.....	25
Figura. 5. Segundas diluciones y tipos de bacterias	26
Figura. 6. Presencia de bacterias anaerobias en ambas cepas	26
Figura. 7. a) Tinción de Gram de levaduras b) tinción de Gram bacterias	30

LISTADO DE ANEXOS

Anexo 1. Verificación de las condiciones del ambiente.....	44
Anexo 2. Evaluación de la efectividad de las concentraciones de 100ppm, 150ppm y 200ppm de penicilina-estreptomicina y 75ppm de gentamicina, administradas al mosquito hembra para eliminar las bacterias del intestino medio.....	45
Anexo 3. Tratamiento con antibiótico a las concentraciones de 100ppm, 150ppm y 200ppm de penicilina-estreptomicina para anaerobias.....	48
Anexo 4. Tratamiento metronidazol 40 ppm.....	50
Anexo 5. Determinación del crecimiento de hongos y levaduras.....	53
Anexo 6. Marcas de reactivos.....	55

RESUMEN

La competencia vectorial (CV) es una característica compleja que gobierna la capacidad de un insecto para adquirir y soportar el desarrollo y la transmisión de un patógeno de un huésped a otro.

Durante su ciclo de vida los mosquitos se encuentran expuestos a una gran variedad de microorganismos y muchos de ellos habitan el intestino medio del mosquito, compartiendo así el mismo entorno con los patógenos ingeridos. Se ha encontrado que es este sitio donde confluyen muchas de las interacciones recíprocas entre el mosquito, bacteria y patógeno hasta el punto de influir en su CV.

Aedes aegypti vector primario y *Aedes albopictus* vector secundario son responsables del dengue, uno de los arbovirus de mayor impacto en salud pública a nivel mundial.

Para entender los mecanismos genéticos que influyen la CV, en el CIDEIM se seleccionaron cepas de *Aedes aegypti* con diferente susceptibilidad al virus dengue-2 a partir de insectos de campo recolectados en diferentes zonas de la ciudad de Cali, cepa susceptible y refractaria. Este trabajo buscó evaluar el efecto de la presencia y ausencia de bacterias en el intestino medio de las cepas seleccionadas de *Aedes aegypti*, susceptible y refractaria, sobre la CV y longevidad, A su vez, determinar la composición bacteriana del intestino medio de ambas cepas.

Para este estudio fue necesario realizar: la estandarización del análisis de bacterias en el intestino, la estandarización del tratamiento con antibiótico, el aislamiento de bacterias e identificación (por medio de tinción de Gram, espectrometría de masas (MALDITOF) y secuenciación), la evaluación de la competencia vectorial y el efecto del antibiótico en su longevidad.

Como resultado de esto, se logró identificar las condiciones de asepsia para evitar la contaminación, se determinó que la concentración de 100ppm de penicilina-100ppm estreptomina-75ppm de gentamicina y 40ppm de metronidazol permitió la eliminación de bacterias aerobias y la disminución de las anaerobias. Microscópicamente se identificaron cinco morfotipos de colonias. Todas fueron Gram negativas según la tinción de Gram. La prueba de MALDITOF identificó una sola bacteria y la de secuenciación reportó tres tipos de bacterias. Los experimentos de CV presentaron dificultades por problemas con los mosquitos. En la cepa refractaria con antibiótico donde se pudo medir la CV, no presentó cambios significativos en los fenotipos esperados (cabezas susceptibles de 17% Vs 13% e intestinos negativos 48% Vs 62,5%), sin embargo esto requiere de varias réplicas. El estudio permitió estandarizar las metodologías para el estudio del efecto de las bacterias en el intestino medio sobre la competencia vectorial. Se observaron diferencias en el crecimiento de bacterias de las cepas en estudio. Las dificultades con los estudios con mosquitos muestran las exigencias de este tipo de estudios.

Palabras claves: composición bacteriana, competencia vectorial, longevidad, antibiótico

ABSTRACT

The vector competence (VC) is a complex characteristic that governs the ability of an insect to acquire, support the development and transmission of a pathogen from one host to another. During its life cycle mosquitoes are exposed to a variety of microorganisms and many of them live in the mosquito midgut, sharing this way the same environment with the ingested pathogens. It has been found that this place is the confluence of many of the reciprocal interactions between the mosquito, bacteria and pathogens to the point of influencing their VC.

Aedes aegypti primary vector and *Aedes albopictus* secondary vector are responsible of dengue, one of the arbovirus greatest impact on public health worldwide.

To understand the genetic mechanisms that the VC influences, in the CIDEIM were selected *Aedes aegypti* strains with different susceptibility to dengue-2 virus, starting from field insects collected in different zones from Cali susceptible and refractory strains. This study sought to evaluate the effect of the presence and absence of bacteria in the midgut of selected strains of the *Aedes aegypti* susceptible and refractory on the VC and longevity. At the same time, determine the bacterial composition of the midgut of both strains. For this study was necessary to realize: the standardization of analysis of bacteria in the intestine, the standardization of antibiotic treatment, the isolation of bacteria and identification using Gram staining, mass spectrometry (MALDITOF) and sequencing, the vector competence assessment and the effect of the antibiotic in its longevity.

As a result of this, the identification of the asepsis conditions to avoid contamination was achieved, it was determined that the concentration of 100 ppm of penicillin-100 ppm streptomycin- 75 ppm of gentamicin and 40 ppm of metronidazole allowed the elimination of aerobic bacteria and a decrease of anaerobic bacteria. Microscopically five morphotypes of colonies were identified. All were Gram-negative according to the Gram staining. MALDITOF test identified a single bacterium and the sequencing reported three types of bacteria. VC experiments presented difficulties by problems with mosquitoes. The refractory strain with antibiotic, where the VC was measured, did not show significant changes in the expected phenotypes (susceptible heads of 17% vs. 13% and 48% negative intestines Vs 62.5%), however this requires multiple replicas. The study allowed standardizing the methodologies for studying the effect of bacteria in the midgut on the vector competence. Differences in the growth of bacteria of the strains were observed. Difficulties with studies with mosquitoes show the requirements for this type of study.

Key words: bacterial composition, vector competence, longevity, antibiotic

1. INTRODUCCIÓN

El dengue es la enfermedad viral, transmitida por el mosquito *Aedes aegypti*, de más rápida expansión en todo el mundo. Desde los últimos 50 años, su ocurrencia ha aumentado 30 veces con la creciente expansión geográfica hacia nuevos países y en la última década de áreas urbanas a rurales (OMS, 2009). Este se ha convertido en uno de los arbovirus de mayor cuidado con el aumento de infección de manera preocupante. Su principal vector es el *Aedes aegypti* y su vector secundario *Aedes albopictus*. Se conocen cuatro serotipos (DEN-1, DEN-2, DEN-3, DEN-4) capaces de infectar y causar la enfermedad que se caracteriza por presentar un amplio espectro clínico, que va desde fiebre de dengue hasta el dengue grave(OMS, 2014).

En Colombia, se han notificado al Sivigila un total de 3451 casos totales de dengue, de los cuales 879 corresponden a dengue y 0 a dengue grave confirmados y 2572 casos probables. Del total de casos prácticamente el 50 % proceden de seis entidades territoriales: Santander (10.8 %), Valle del Cauca (10.3 %), Norte de Santander (8.17 %), Huila (8.17 %), Tolima (7.4 %) y Antioquia (5.4 %) (INS, 2014).

A pesar de los múltiples esfuerzos por conseguir la cura para ésta enfermedad, hasta el momento no se cuenta con vacuna ni tratamiento para éste. Por lo que se hace necesario mantener una vigilancia activa, estudiar la ecología y la biología del *Aedes aegypti* y en especial factores como su competencia como vector. Los métodos tradicionales que se han venido empleando tales como el uso de insecticidas, han generado resistencia que a su vez afecta no sólo la salud de los habitantes sino que contrae problemas ambientales (Ramirez J, et al, 2012). Lo que ha contribuido a que en los últimos años gran parte de las investigaciones están dirigidas a la implementación de nuevas estrategias de control.

Parte de estos esfuerzos e investigaciones se han basado en uno de los factores fundamentales que determina la capacidad de transmitir el virus (competencia vectorial), que es la susceptibilidad a infectarse y desarrollar el virus una vez entra en contacto con el portador. De manera general, los virus cuando son ingeridos por el vector deben vencer diferentes barreras. En el caso del mosquito, debe atravesar el intestino donde se replican y atraviesan la primera barrera para llegar al hemocele (cavidad secundaria de los artrópodos). Seguidamente, se replican nuevamente y se diseminan en todo el cuerpo del mosquito y finalmente, alcanzan glándulas salivales. Ahí se encuentran listos para ser transmitidos a otro huésped susceptible. De esto se obtiene que una población normal de mosquitos contiene fenotipos que van desde totalmente susceptibles a totalmente refractarios a la infección viral. Lo que permite inferir que la epidemia incrementará cuando se presente una población con mosquitos susceptibles en mayor proporción (Pernalet M, 2008-2009).

Recientes estudios han revelado que los mosquitos están expuestos a una gran variedad de microbios en su hábitat natural y poseen un sistema innato capaz de generar una respuesta frente a la exposición al patógeno (Ramirez J. et al, 2012). También, se ha encontrado que la respuesta para todo tipo de virus no puede ser la misma y que el propio virus es quien se encarga de generar respuestas diferentes en los insectos; pero en el caso de los arbovirus, estos pueden generar la activación de las mismas vías inmunológicas que se activan frente a la exposición a un microbio (Dimopoulos G.et al, 2008).

Por lo anterior, el presente estudio se enfoca en la evaluación del efecto de la composición bacteriana del intestino medio de las cepas de *Aedes aegypti* susceptible y refractaria al virus dengue-2, con el fin de contribuir al proceso de desarrollo e investigación de otro método de control de este vector.

El desarrollo de este trabajo involucró la estandarización de las concentraciones de cada uno de los antibióticos para garantizar la eliminación y/o máxima disminución de bacterias aerobias y anaerobias. Seguidamente se realizó la identificación de las bacterias presentes en el intestino medio por medio de la técnica de laboratorio denominada tinción de Gram, la técnica de espectrometría de masas y la técnica molecular “secuenciación”. Y por último, se realizó la medición de la competencia vectorial del intestino medio de *Aedes aegypti* por medio de la técnica de inmunofluorescencia indirecta.

El presente trabajo de grado aporta la estandarización del antibiótico como herramienta para posteriores investigaciones de competencia vectorial y además, aporta al conocimiento para encontrar nuevas estrategias de control de este vector.

2. DESCRIPCIÓN DEL TRABAJO

2.1 PLANTEAMIENTO Y JUSTIFICACIÓN DEL PROBLEMA

En Colombia, el dengue ha representado un gran problema de salud pública debido a los múltiples factores de riesgo entre los cuales se encuentra la presencia de criaderos, el comportamiento de la comunidad, el clima que facilita la reproducción del mosquito, las actividades no continuas de control vectorial, entre otros que han promovido transmisión constante con tendencia creciente. El comportamiento de los ciclos de la epidemia son cada vez más cortos, el aumento de brotes en las diferentes ciudades por dengue grave y la circulación de sus cuatro serotipos, la infestación por *Aedes aegypti* de más del 90% del territorio nacional, entre otros; han sido causa de la transmisión de esta enfermedad (OPS/OMS, 2010).

De acuerdo con el último boletín nacional de dengue del Instituto Nacional de Salud, hasta la segunda semana del mes de enero del 2014 se notificaron al Sivigila un total de 3451 casos totales de dengue. El 50 % de los casos de dengue proceden de seis entidades territoriales: Santander (10.8 %), Valle del Cauca (10.3 %), Norte de Santander (8.17 %), Huila (8.17 %), Tolima (7.4 %) y Antioquia (5.4 %), cuya población de riesgo corresponde a la ubicada en la zona urbana del país (INS, 2014).

Existen diferentes factores de riesgo ante la infección como: factores individuales del huésped, factores del agente de la enfermedad y los factores de los vectores (Velasco, J, 2013). Este último factor, es objetivo del presente estudio ya que hace parte de la evaluación e implementación de nuevas estrategias para disminuir la transmisión del virus dengue por *Aedes aegypti* (Ocampo C . et al, 2013).

Dentro de este tipo de factores, se encuentra la competencia vectorial como la capacidad intrínseca del artrópodo (*Aedes aegypti*) para transmitir el virus. Hasta el momento, CIDEIM ha estudiado a partir de la selección de las cepas susceptible y refractaria al virus dengue-2, recolectadas de diferentes zonas geográficas de la ciudad de Cali y el entendimiento de los mecanismos moleculares de la respuesta inmune que se activan al contacto con el virus. Estos estudios sugieren un aumento en la respuesta inmune de la cepa refractaria, en especial el mecanismo de apoptosis, que elimina la infección por el virus dengue (Ocampo C . et al, 2013).

Sin embargo, estudios recientes han notificado que las bacterias endosimbiontes juegan un papel importante en la biología del mosquito y su respuesta inmune (Zouache, K et al, 2011). Por lo anterior, el presente trabajo pretende responder la pregunta ¿existirán diferencias en la composición bacteriana del intestino medio del *Aedes aegypti* que puedan estar influenciando la competencia vectorial y su longevidad? Se espera contribuir al conocimiento de los factores que influyen en la transmisión de virus dengue por *Aedes aegypti*, con el fin de identificar nuevas estrategias que permitan inhibir el desarrollo del virus dengue en este vector.

Durante el desarrollo de este trabajo se realizó un proceso de investigación en el cual se pudo determinar la concentración óptima de los antibióticos a la cual se garantiza la máxima reducción de carga bacteriana presente en el intestino medio del mosquito sin afectar su longevidad y de esta manera, evaluar el efecto de la composición bacteriana en la transmisión del virus. Con esto se busca brindar herramientas a la comunidad de control de vectores para que siga indagando y aportando conocimiento para determinar nuevas estrategias de control sin afectar el medio ambiente y generar un aumento en la problemática de salud pública.

3. MARCO DE REFERENCIA

3.1 DENGUE

El dengue es una infección transmitida por mosquitos, que se presenta en las regiones tropicales y subtropicales del planeta (OMS, 2014). Se conocen cuatro serotipos diferentes del virus DEN-1, DEN-2, DEN-3 y DEN-4, estos serotipos pertenecen al género *Flavivirus*, de la familia *Flaviviridae*. Su principal vector es el mosquito *Aedes aegypti* y su vector secundario el *Aedes albopictus* (Salazar, M. et al, 2007).

El virus se trasfiere a los seres humanos por la picadura de mosquitos hembra infectados. Los síntomas se exhiben al cabo de un periodo de incubación de 4 a 10 días después de la picadura de un mosquito infectado y por lo común duran entre 2 y 7 días. De esta manera, las personas se convierten en portadoras del virus y multiplicadores del virus, y una vez el mosquito se infecta al picarla, lo propaga (OMS, 2014).

3.2 EPIDEMIOLOGÍA DEL DENGUE

En los últimos años se ha visto un aumento enorme de la incidencia de dengue en todo el mundo. Más de 2500 millones de personas, más del 40% de la población mundial están en riesgo de contraer el dengue. Estudios realizados por la OMS calculan que cada año se producen entre 50 millones y 100 millones de infecciones por el virus del dengue en el mundo (OMS, 2014).

Anteriormente, hacia la década de los 70's, después de las estrategias de erradicación del vector, sólo afectaba a nueve países pero hoy en día la enfermedad se ha vuelto endémica (endémico= que se repite y se extiende frecuentemente, permanece en la región) afectando a más de cien países en todo el mundo, obteniéndose cifras de más de 2,35 millones de casos de dengue en el 2010 (OMS, 2014).

Anualmente, alrededor de unas 500000 personas que padecen dengue grave (niños en gran proporción) necesitan hospitalización y el 2,5% fallecen (OMS, 2014).

En Colombia, existen 879 casos de dengue y 0 de dengue grave confirmados, y cerca de 2500 casos de dengue y 72 de dengue grave probables, para un total de 3451 de casos de dengue según el sistema de Vigilancia de Salud Pública (INS, 2014)

Lo más preocupante y que alerta al Instituto Nacional de Salud es que en el año 2013 se reportó al Valle del Cauca como el primer departamento con más casos en el país con la circulación de tres de los serotipos encontrados (1, 2 y 4). Simultáneamente, se reportaron 32 muertes probables por dengue y 12 de ellas confirmadas, reafirmando una letalidad del 2,8% por dengue grave.

3.3 SINTOMATOLOGÍA

El dengue se caracteriza por fiebre, dolor de cabeza, dolor en los huesos, dolores en las articulaciones, pérdida del apetito y dolor detrás de los ojos. Los síntomas de alarma son decaimiento mayor, permanencia de fiebre, sangrado en las encías, en la orina, moretones en la piel y dolor abdominal persistente. Por lo cual, es muy común que se confunda con una fiebre común y que lo primero que se haga es automedicarse y silenciar la enfermedad, lo cual conlleva al deterioro de la salud de las personas y que se presente mayor resistencia (Ministerio de Salud, 2014).

3.4 CONCEPTOS GENERALES ACERCA DEL VIRUS

3.4.1 Clasificación de la infección

Según la OMS la infección por el virus del dengue puede clasificarse en:

- ✓ Primaria: se presenta cuando los individuos entran en contacto por primera vez con alguno de los serotipos
- ✓ Secundaria: cuando se exponen a otro serotipo del virus

3.4.2 Taxonomía

El dengue es una enfermedad vectorial causada por el virus que pertenece a la familia *Flaviviridae* y cuyo género es el *Flavivirus*.

3.4.1 Genómica

El genoma del virus está constituido por una molécula de ácido ribonucleico de cadena única y aproximadamente con 11 kilobases (kb) y de relativamente alta variabilidad genómica. El ARN genómico es de polaridad positiva y funciona como ARN mensajero al traducirse directamente en los ribosomas durante el proceso de replicación (López, A., 2010).

3.5 VECTOR(ES) DEL DENGUE

Aedes aegypti, es un insecto de la familia *Culicidae* originario de África, de la región de Egipto (EcuRed, 2013). Es conocido como el principal vector del virus

del dengue, es una de las pocas especies dentro del subgénero *Stegomyia* que presenta una asociación íntima con el ser humano pues son la principal fuente de sangre y sus utensilios son los principales sitios para la ovoposición y desarrollo larval (Barry, J. et al, 1996). Por esta misma razón el virus dengue ha sido difícil de controlar.

También se conoce un segundo vector de éste, el *Aedes albopictus* originario de Asia que se ha logrado propagar hasta Europa y el América del norte. Posee gran adaptabilidad y sobrevive a temperaturas bajas en Europa (OMS, 2014).

Los mosquitos ponen sus huevos en depósitos de agua limpia como albercas, floreros, llantas, baldes con agua y cualquier recipiente que se encuentre a la intemperie y pueda recoger y/o almacenar agua. Allí se desarrollan las larvas y después pasan a su estadio de pupa y seguidamente a su forma adulta en la cual pueden transmitir el virus (Ministerio de Salud, 2014)

3.6 ¿EXISTE ALGÚN TIPO DE TRATAMIENTO? ¿CÓMO SE CONTROLA?

Hoy en día, no existe ningún tipo de vacuna que proteja contra el dengue y mucho menos un tratamiento específico para éste. No obstante, la asistencia médica prestada puede salvar vidas y reducir las tasas de mortalidad de más del 20% a menos del 1% (OMS, 2014). Y por lo cual, se requiere que en zonas endémicas, la vigilancia sea permanente en la que se realicen acciones de control de vectores (INS, 2011). Por eso, las medidas de control sobre los casos positivos son: el paciente que posea algún tipo de dengue debe ser hospitalizado y permanecer bajo toldillo durante los primeros ocho días que puede infectar al mosquito (INS, 2011).

Hasta ahora, el tratamiento más efectivo para controlar o prevenir la transmisión del virus dengue consiste en: evitar que los mosquitos tengan lugares aptos para depositar sus huevecillos; cubrir, vaciar y limpiar periódicamente los recipientes donde se almacena agua (OMS, 2014). Se han empleado otros métodos como la aplicación de insecticidas, las campañas de prevención, y la eliminación total del vector. Pero esto no ha sido suficiente. Se ha encontrado que los mosquitos han logrado adquirir resistencia a los diferentes insecticidas empleados, como temephos (Grisales N, et al., 2013) Simultáneamente, los insectos han desarrollado mecanismos para protegerse ellos mismos de bacterias, hongos y agentes infecciosos (Barón O. et al, 2010).

A pesar de que *Aedes aegypti* es el principal vector del virus dengue, parte de la población de mosquitos no permite el desarrollo del virus porque probablemente

tienen barreras biológicas que afectan la infección, replicación y difusión del virus que influyen en su competencia vectorial (Barón O. et al, 2010).

3.7 ¿QUÉ ES COMPETENCIA VECTORIAL Y QUE SE HA LOGRADO INVESTIGAR?

Se conoce como competencia vectorial a la habilidad del vector de soportar el desarrollo y la propagación del patógeno y/o agente infeccioso (Barry, J. et al, 1996). Los factores genéticos contribuyen en gran medida al éxito de los mosquitos como vectores de enfermedades, que influyen en características tales como la susceptibilidad y la resistencia a los insecticidas (Ayres et al, 2003).

CIDEIM en su proceso de investigación sobre CV, ha estado en la tarea de identificar los mecanismos de respuesta inmune de *Aedes aegypti* contra la infección del virus dengue (Clara Ocampo comunicación personal, 2013). Hasta el momento, se ha evaluado la variación de la competencia vectorial al virus dengue y se identificaron genes de expresión diferencial asociados a la refractoriedad en poblaciones de *Aedes aegypti*, bases para entender las interacciones moleculares entre el vector y el patógeno.

Los mosquitos, como todos los organismos vivos, poseen bacterias que habitan en el intestino medio que ayudan a la digestión y brindan nutrientes esenciales en la dieta. También se ha encontrado que ésta microbiota varía dependiendo del tipo de alimentación que presenten estos insectos (Feldhaar, 2011). Los microorganismos patógenos que infectan los mosquitos a través del intestino medio comparten este hábitat con las bacterias. Por lo cual, estudios moleculares han revelado que las interacciones intrínsecas entre el mosquito, el virus y la comunidad bacteriana presente en el intestino medio del *Aedes aegypti* afectan la competencia vectorial promoviendo la reducción de la infección por el virus (Ramirez J, et al, 2012).

Por otra parte, CIDEIM ha reportado que la alta variabilidad de la competencia vectorial de *Aedes aegypti* en Cali, indica la presencia natural de mosquitos susceptibles y refractarios a la infección por el virus Dengue-2 con distintos tipos de barrera ante la infección. La barrera de infección del intestino medio es uno de los primeros mecanismos que el virus debe superar para lograr la infección exitosa; es decir, para que el virus sea viable y se encuentre disponible en las glándulas salivales del mosquito y pueda infectar, se debe garantizar la infección del intestino medio donde el virus se replica y finalmente se pueda diseminar en todo el cuerpo (Barón O. et al, 2010). De lo anterior, se puede inferir que existen mosquitos que tienen una barrera de infección de intestino medio y otros con

barrera de escape de intestino medio. Los primeros no logran infectar el intestino medio y por lo tanto, no hay infección; los segundos infectan intestino medio pero no alcanzan glándulas salivales. Estas diferencias en la competencia vectorial en las cepas de campo permitieron la selección de cepas susceptibles y refractarias a la infección del virus dengue realizada en CIDEIM. Los estudios moleculares realizados hasta ahora, sugieren el mecanismo de apoptosis como el principal mecanismo para la eliminación de la infección por el virus dengue en la cepa refractaria (Ocampo C . et al, 2013).

Como se ha podido notar, entender la competencia vectorial y los mecanismos moleculares involucrados en la relación vector-patógeno es importante para el uso a futuro de estrategias transgénicas o el desarrollo de nuevos blancos terapéuticos.

3.8 ¿CÓMO SE DETECTA SI EL MOSQUITO ESTÁ INFECTADO?

Actualmente, el diagnóstico del dengue es una de las prioridades debido a la alta incidencia de esta enfermedad re-emergente. Por lo cual, se emplean diferentes técnicas moleculares como RT-PCR y qRT-PCR; y técnicas directas, entre las cuales se encuentra la inmunofluorescencia, que consiste en la unión inmunológica de un anticuerpo marcado con un fluorocromo a su antígeno (Acosta-Bas, B. et al, 2005).

A pesar de que existen dos tipos de inmunofluorescencia, la empleada para detectar la infección en el mosquito y para desarrollar el estudio, se trata de la inmunofluorescencia indirecta (IFI) que consiste en una técnica de doble capa en donde se aplica el anticuerpo sin marcar directamente sobre el sustrato de tejido y se visualiza por un tratamiento con un suero anti-inmunoglobulina conjugado con fluorocromo (INMUNOFLUORESCENCIA, 2014)

Este proceso consiste en dos etapas: inicialmente se fija sobre un portaobjetos la cabeza del mosquito con una solución de acetona/PBS. Seguidamente, se les adiciona una solución de PBS con los anticuerpos del virus DEN-2, se incuba en un medio de humedad a 37°C por unos 45min y luego se le realiza dos lavados exhaustivos con PBS por un minuto y luego con agua. Después, se le adiciona el fluorocromo con el azul de Evans, éste último usado generalmente para diagnóstico, a dicha mezcla se le realiza el mismo procedimiento de lavado que cuando se le adiciona el anticuerpo. Finalmente, se observa en el microscopio de inmunofluorescencia donde se observan unos círculos de color verde que fluorescen mucho más que otros, tal como se observan a continuación en la figura 1 (Protocolo estandarizado en CIDEIM).

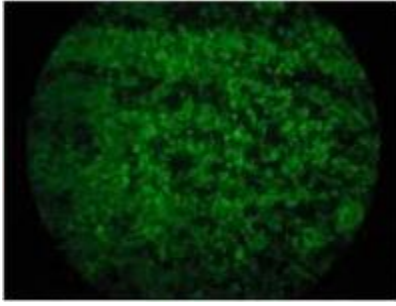


Figura. 1 Imagen de inmunofluorescencia indirecta (IFI)

Seguidamente se diligencia un formato, en el cual se registra como positivo para cabeza en el caso de que se observe este tipo de fluorescencia, es decir que el virus infectó no sólo las paredes del intestino sino que alcanzó las glándulas salivales, por lo cual el mosquito se ha convertido en vector y es susceptible al virus dengue. Si no aparece este tipo de fluorescencia, se marca como negativo y se realiza el mismo tratamiento de Inmunofluorescencia indirecta (IFI) observándose si el intestino es completamente refractario, es decir, el intestino no está infectado o si el intestino se infectó pero no alcanzó las glándulas salivales por eso no transmitirá el virus.

3.9 ¿QUÉ SE HA LOGRADO ESTUDIAR SOBRE COMPOSICIÓN BACTERIANA?

A pesar de que se ha encontrado que las bacterias endosimbiontes desempeñan un papel importante en la biología del mosquito y en especial en su respuesta inmune, actualmente el conocimiento sobre estas comunidades bacterianas asociadas con los mosquitos es limitado. Sin embargo, algunos de los estudios han logrado identificar diferentes morfotipos de bacterias tales como:

- 1- *Acinetobacter genomus* sp, *Staphylococcus saprophyticus*, *Pseudomonas* sp, *Acinetobacter* sp, *Enterobacter* sp, *Asaia* sp, *Uncultured bacterium clone*. Encontradas en un estudio de identificación bacteriana de *Aedes aegypti* de mosquitos de campo obtenidos de diferentes zonas de Madagascar por medio de la técnica de secuenciación (Zouache, K et al, 2011).
- 2- *Asaia* sp, *Klebsiella* sp y *Serratia* sp, encontradas por medio de la técnica de hibridación de ADN-ADN (Gaio, et al, 2011).
- 3- *Micrococcus* sp, *Acetobacter ghanensis*, *Asaia Krungthepensis*, *Asaia bogorensis*, *Roseomonas* sp, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus caprae*, *Lactococcus lactis*, *Paenibacillus* sp, *Chromobacterium haemolyticum*, *Comamonas testosteroni*, *Shinella kummerowiae*, *Elizabethkingia meningoseptica*, *Chryseobacterium* sp, *Acinetobacter* sp, *Aeromonas*

hydrophila, *Aeromonas sp*, *Enterobacter hormaechei*, *Enterobacter ludwigii*, *Shigella sp*, *Pantoea dispersa*, *Pantoea agglomerans*, *Proteus mirabilis*, *Proteus penneri*, *Pseudomonas sp*, *Pseudomonas stutzeri*, *Serratia marcescens*, *Leclercia sp*, encontradas en los mosquitos de diferentes zonas de Panamá por medio de la secuenciación (Ramirez J, et al, 2012).

- 4- *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas media*, *Aeromonas salmonicida smithia*, *Bacillus cereus*, *Brevibacillus agri*, *Edwardsiella tarda*, *Pantoea agglomerans*, *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter gergoviae*, *Escherichia coli*, *Microbacterium laevaniformans*, *Microbacterium oxydans*, *Providencia rustigianii*, *Pseudomonas alcaligenes*, *Burkholderia mallei*, *Ralstonia pickettii*, *Burkholderia pseudomallei*, *Pseudomonas putida*, *Serratia odorífera*, *Xenorhybdus luminiscens*, *Unidentified* (Paingankar M, et al, 2012).

También, es importante mencionar que en recientes estudios se ha podido corroborar que la introducción de agentes microbianos tales como *Serratia odorífera* y *Wolbachia*, aumentan la susceptibilidad a la infección por el virus dengue o generan protección contra estos mecanismos, respectivamente (Ye, Y. et al, 2013). Además, se ha encontrado que existen en el epitelio del intestino medio del mosquito especies reactivas de oxígeno, que se relacionan inversamente con la presencia de bacterias, lo cual implica que una vez los mosquitos son alimentados con agua azucarada la proporción de bacterias es mayor en comparación a la proporción obtenida una vez son alimentados con sangre, pues disminuyen drásticamente (Oliveira, J. et al, 2011).

Finalmente, como se observa en los artículos reportados la microbiota encontrada en el intestino medio del mosquito de *Aedes aegypti* es bastante amplia. La composición bacteriana en *Aedes aegypti* varía durante su ciclo de vida, el tipo de alimentación al cual se encuentre sometido y la variación en la temperatura del ambiente en el cual habitan (Paingankar M, et al, 2012).

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar si la presencia de bacterias en el intestino medio de las cepas de *Aedes aegypti* susceptible y refractaria a la infección por virus dengue afecta su competencia vectorial y longevidad.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Medir la longevidad y competencia vectorial de las cepas de *Aedes aegypti* susceptible y refractaria a la infección por el virus del dengue, en presencia y en ausencia de bacterias.
- Identificar la composición de las bacterias, en el intestino medio de la cepas de *Aedes aegypti*, susceptible y refractaria a la infección por el virus dengue.
- Establecer si existen diferencias entre las bacterias presentes en las cepas de *Aedes aegypti* susceptible y refractaria y, evaluar si estas diferencias afectan la competencia vectorial.

5. METODOLOGÍA

El presente trabajo se llevó a cabo mediante las siguientes etapas:

5.1 MANTENIMIENTO DE MOSQUITOS DEL LABORATORIO

Los huevos de cada cepa previamente seleccionados según la metodología descrita por (Caicedo, P. et al , 2013) se colocan en un contenedor al cual se les ha adicionado previamente 100mL de agua de clorada. A estos se les adiciona aproximadamente 3mL de hígado de res como alimento. A las 24h una vez se obtienen las larvas se pasan a un contenedor con 1L de agua de clorada y se les adiciona TetraMin (alimento para peces) hasta obtener pupas. Las pupas son trasladadas a un vaso con agua de clorada y dispuestas dentro de una jaula con malla para que los adultos emerjan.

5.2 VERIFICACIÓN DE LAS CONDICIONES DEL MEDIO AMBIENTE PARA LA POSTERIOR DETECCIÓN DE BACTERIAS

Para garantizar que el medio ambiente no afecte la identificación de las bacterias presentes en el intestino, se estandarizó el proceso de disección y siembra para identificar el protocolo de desinfección:

Primero se sanitizaron todos los materiales a emplear con etanol al 70%, seguidamente se sanitizaron las manos enguantadas y se dejó evaporar. Se esterilizaron las pinzas y se manejó tapabocas al igual que el mechero a lo largo del procedimiento. Una vez aseguradas éstas condiciones, se expuso una caja de Petri con agar LB como control de ambiente y se procedió a tomar seis hembras de la cepa *Rockefeller*, las cuales se dispusieron en unas jaulas más pequeñas para ponerlos en frío a -20°C por 5 min para dormirlos. Luego, se mantuvieron sobre una pila de hielo con el fin de conservar el frío y se tomó cada mosquito, se enjuagó en etanol al 70% de uno a dos minutos. Posteriormente, se realizó la disección del intestino en una gota de PBS estéril y con ayuda de pinzas estériles se tomó el intestino y se pasó inicialmente por etanol y seguidamente por PBS para luego transferirlo cerca al mechero a los 100µL de PBS estéril previamente servidos dentro de la cabina de flujo laminar en un tubo eppendorf de 1,5mL. Después, se maceró el intestino en cabina con ayuda de aplicadores plásticos estériles por fuerza mecánica con ayuda de un motor tull y se sembró cada macerado de intestino en cajas de Petri con agar LB, al igual que el PBS estéril como control negativo, con ayuda de perlas estériles en agar LB, se sellaron con

papel osmótico para evitar contaminación, se identificaron adecuadamente y se dejaron a temperatura ambiente por 48h.

De aquí se determinó que el PBS debe estar completamente estéril y que el medio ambiente no era el más adecuado para la detección de bacterias, pues persistía un hongo. Gracias a esto, se pudo determinar que la manipulación de las cajas de Petri dentro del laboratorio requiere de gran cuidado, una vez se haya realizado la siembra dentro de la cabina de flujo laminar.

5.3 EVALUACIÓN DE LA EXISTENCIA DE BACTERIAS PRESENTES EN EL INTESTINO MEDIO DE *Aedes aegypti* DE LAS CEPAS SUSCEPTIBLE Y REFRACTARIA AL VIRUS DENGUE

Se llevó a cabo un procedimiento inicial que consistió en la alimentación de aproximadamente veinte mosquitos de la cepa susceptible y de la cepa refractaria una vez emergidos con una solución de azúcar al 10% por tres días, luego se realizó la disección de acuerdo al protocolo descrito anteriormente (ítem 5.2) realizando diluciones de 1:10, 1:100 y 1:1000. Este ensayo se realizó por duplicado y requirió de cinco intestinos por cada cepa para cada réplica y se usó agar Mueller Hinton (más consistente que el agar LB). Gracias a que en este ensayo previo se logró determinar que las diluciones empleadas eran demasiado grandes para la cantidad de muestra empleada, se realizó un experimento similar empleando las diluciones de 1:10, 2:10, 3:10 determinadas a criterio propio, con el fin de que se pudiera observar el crecimiento y observar las diferencias entre ambas cepas. Una vez identificada la presencia de bacterias aerobias en el intestino medio del mosquito, se evaluó la existencia de bacterias anaerobias empleando el medio de tioglicolato (óptimo para este tipo de crecimiento), cinco intestinos por cada cepa (susceptible y refractaria) con los cuales se realizó el mismo tratamiento del ítem 5.2 y se sirvió el contenido de cada macerado en dos tubos con medio de tioglicolato.

5.4 ESTANDARIZACIÓN DEL ANTIBIÓTICO

Para garantizar la erradicación o la máxima disminución de bacterias se empleó lo sugerido en la literatura, 100µg/mL (ppm) de penicilina y 100 ppm de estreptomycin y 75ppm de gentamicina (Blumberg BJ, et al, 2013).

El coctel de antibiótico (100ppm de penicilina, 100ppm de estreptomycin y 75ppm de gentamicina) fue preparado en agua ultra purificada estéril. 20 mosquitos de cada cepa (susceptible y refractaria) fueron alimentados en una jaula durante cinco días con esta solución de antibiótico en una mota de algodón y de igual

forma, en otro algodón se les administró solución azucarada. Una vez elaborado el tratamiento con antibiótico, se realizó la disección de acuerdo con el protocolo de desinfección anteriormente descrito.

Debido a que en el ensayo anterior se observó la presencia de bacterias, se evaluó otra metodología. En esta el antibiótico fue preparado en el agua azucarada al 10% del que se alimentaban comúnmente, variando las concentraciones así: 100ppm, 150ppm y 200ppm tanto de penicilina como de estreptomicina más 75ppm de gentamicina, para evaluar el efecto de estas concentraciones sobre las bacterias aerobias y de igual forma, sobre las bacterias anaerobias. Se emplearon 20 mosquitos por jaula de cada concentración para la cepa susceptible, y para la cepa refractaria solo se contó con 15 mosquitos por jaula (ya que no se contaba con muestra suficiente).

Sin embargo, dado a que en este ensayo no se contó con muestra suficiente para realizar dicha evaluación por duplicado en el medio de tioglicolato (bacterias anaerobias), se repitió el proceso de alimentación sólo para realizarla siembra en dicho medio, empleando al igual que en experimentos anteriores, 20 mosquitos por jaula para cada concentración y usando como control PBS estéril.

Gracias a que ninguno de los tratamientos anteriores eliminó la presencia de bacterias anaerobias, se realizó un nuevo tratamiento con la introducción del metronidazol empleando las concentraciones de 20ppm, 40ppm y 60ppm, manteniendo las concentraciones de 100ppm de penicilina, 100ppm de estreptomicina y 75ppm de gentamicina por cuatro días.

Por cuestiones de tiempo sólo fue posible evaluar su efectividad a los cuatro días de tratamiento. Una vez realizada la siembra de estos mosquitos tratados, se observó crecimiento, por lo que fue necesario repetir el tratamiento bajo las mismas condiciones con mayor número de días (5 días). En estos experimentos no hubo crecimiento de bacterias ya que el crecimiento evidenciado no era propio de un crecimiento bacteriano sino de levaduras. Por lo cual, en experimentos posteriores se realizaron ensayos con el fin de evaluar qué promovía dicho crecimiento.



Figura. 2 Visualización del proceso de disección

5.5 DETERMINACIÓN DEL CRECIMIENTO DE LEVADURAS

Debido a que en el proceso de estandarización del antibiótico, se observó un constante crecimiento de hongos y levaduras, se realizaron tres experimentos para determinar qué promovía dicho crecimiento:

Primero, se realizó una variación en el protocolo de desinfección. Este consistió en enjuagar el mosquito previamente en etanol al 70% y una vez realizada la disección del intestino, éste se enjuagó durante dos minutos en etanol y posteriormente se pasó por PBS estéril y con ayuda de una pinza estéril se transfirió al tubo eppendorf abierto cerca al mechero. Al mismo tiempo, se realizó el protocolo regular de desinfección como control y se empleó también el PBS estéril como control negativo. Para éste, se emplearon cuatro intestinos por cepa sin tratamiento con antibiótico, dos para el tratamiento por dos minutos y dos para el control, no se realizó por duplicado.

Segundo, se siguió con el protocolo regular de desinfección empleando dos mosquitos por cepa tratados con antibiótico y sin tratamiento para determinar si el antibiótico promovía el crecimiento de levaduras.

Por último, se realizó el mismo procedimiento usando el mismo tamaño de muestra, con la diferencia de que se realizó la siembra de la solución de azúcar al 10% empleada para alimentar los mosquitos.

5.6 IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE BACTERIAS

Las bacterias obtenidas en ambas cepas (ítem 5.3) fueron identificadas por varios procesos. Primero se evaluó la tinción de Gram para identificar si eran Gram

positivas o Gram negativas. El procedimiento de Gram se describe a continuación:

Se realizó un extendido en un portaobjetos de las colonias identificadas como bacterias obtenidas del ensayo inicial de la estandarización del antibiótico, del proceso de determinación del crecimiento de levaduras y de la siembra de cinco intestinos de ambas cepas en una placa de agar Mueller Hinton con el cual se pretendía realizar el aislamiento de bacterias (por motivos de tiempo, sólo se hizo la siembra). Luego, se cubrió la muestra con gotas del reactivo cristal violeta (contiene 2g de violeta cristal, 1g de oxalato de amonio y 100mL de agua desmineralizada tipo II) se dejó durante un minuto y se lavó con suficiente agua. Seguidamente se le añadió lugol (0,4g de yodo metálico, 0,6g de yoduro de potasio y 100mL de agua desmineralizada tipo II) se dejó por un minuto y se lavó con suficiente agua. Después se le añadió el alcohol acetona (80% de alcohol etílico y 20% de acetona) y se realizó el mismo lavado. Por último, se le adicionó la safranina (2g de safranina, 100mL de alcohol etílico al 96%) se dejó por un minuto, se lavó y se dejó secar para observar al microscopio e identificar el tipo de bacteria a partir de su coloración. Si se observaba una coloración rosada se clasificaba como Gram negativa y si se observaba una coloración morada se clasificaba como Gram positiva.

Por otra parte, se realizó una identificación empleando el equipo de espectrometría de masas (MALDITOF) a cargo del departamento de resistencia bacteriana de CIDEIM. Este equipo permite la identificación de microorganismos mediante el análisis de proteínas, principalmente ribosomales, a partir de colonias o directamente de muestras a través de la creación de un espectro de masas el que es específico para cada especie. La identificación se realizó a partir de un inóculo tomado a partir de una colonia aislada en cultivo puro que fue depositado por duplicado sobre una tarjeta de análisis. Por otro lado, se realizó una identificación por medio de la secuenciación realizada a partir del ADN extraído de las cinco colonias como se describe a continuación.

5.7 EXTRACCIÓN DE ADN, PCR Y SECUENCIACIÓN

Para realizar la secuenciación, se realizó la extracción del ADN de las colonias identificadas como bacterias y luego la PCR del gen 16S tal como se describe a continuación. Posteriormente, se realizó la electroforesis (ver ítem 5,8) con el fin de obtener el amplicón (fragmento de ADN), purificarlo y enviarlo a secuenciar. Sin embargo, sólo se necesitó el ADN extraído de cada colonia el cual se mandó a secuenciar a Macrogen. El procedimiento fue el siguiente:

Inicialmente, se realizó la siembra de cada una de las bacterias seleccionadas en agar LB líquido con ayuda de una punta de 10µL, luego se incubó a 37°C por 24h. Seguidamente se centrifugó a 3000rpm por 5min y luego se descartó el sobrenadante con el fin de concentrar la muestra, luego se le adicionó 500µL de PBS estéril y se re suspendió la muestra en un tubo eppendorf de 1,5mL debidamente rotulado. Una vez obtenidas las muestras se centrifugaron a 7500rpm por 10min y se le descartó el sobrenadante. Para la extracción del ADN se utilizó el kit DN-easy de Qiagen. El protocolo se describe a continuación:

Se re suspendió el pellet en 180µL de Buffer ATL (induce la lisis de los tejidos celulares con el fin de liberar y exponer el ADN de la célula durante las etapas iniciales del proceso de extracción) y se le adicionó 20µL de proteinasa K (encargada de romper las membranas y degradar las proteínas liberadas al medio), se mezcló (vortex) y se puso en baño maría a una temperatura de 56°C por 12 horas para asegurar que el tejido estuviera completamente lisado.

Después se puso en el vortex por 15s, se le adicionó 200µL de buffer AL a la muestra y se mezcló exhaustivamente en el vortex. Luego se le adicionó a 200µL de etanol (96-100%) y se realizó una mezcla nuevamente.

Luego se pipeteó la mezcla anterior, se pasó a la columna de centrifugación del DN-easy dispuesta en un tubo colector de 2mL, y se centrifugó a 8000rpm por un minuto. Se descartó el filtrado y el tubo colector. Se tomó la columna y se puso en un nuevo tubo colector, se le adicionaron 500µL del buffer AW1, se centrifugó por 1min a 8000rpm y se descartó el filtrado y el tubo colector. En un nuevo tubo colector se puso la columna (muestra), se le añadió 500µL del buffer AW2 y se centrifugó por tres minutos a 14000rpm, se descartó el filtrado y el tubo colector. Luego, se tomó un tubo para centrífuga de 1,5mL en el cual se puso la columna a la cual se le adicionó 200µL de buffer AE directamente sobre la membrana. Se incubó a temperatura ambiente por un minuto y se centrifugó por un minuto a 8000rpm para obtener la elución del ADN.

Previamente al desarrollo de la PCR se realizó la cuantificación del ADN por medio del Nanodrop, donde se obtuvo la cantidad de ácidos nucleicos de cada una de las muestras identificadas como bacterias. Las muestras se tomaron a la concentración de ADN que reportó el espectrofotómetro, ya que algunas de las muestras representaron concentraciones muy bajas de ADN y era difícil normalizar a una sola concentración todas las muestras. Seguidamente se realizó la PCR como se describe en las tablas 1 y 2. La electroforesis se realizó en gel de agarosa al 1% con el fin de obtener la separación, identificación y purificación de

los fragmentos de ADN y poder enviar a secuenciar. Sin embargo, no fueron necesarios los resultados obtenidos de la electroforesis realizada por dos razones: la primera, en la electroforesis realizada el control negativo salió positivo y evidenció una banda que fue repetitiva en dos de las muestras. La segunda, la entidad encargada de la secuenciación sólo requirió el ADN eluido de cada colonia, obtenido del proceso de extracción.

Tabla 1. Mix para la PCR

	1mx (µg/mL)	7mx(µg/mL)
Buffer 10X	2,5	17,5
H₂O	17,5	122,5
DNTPs (10mM)	0,8	5,6
Pf 16s(10mM)	0,8	5,6
Pr 16s(10mM)	0,8	5,6
MgCl₂(50mM)	1,0	7,0
Taq recombinante	0,1	0,7
ADN	5µL	

Tabla 2. Ciclo térmico de la PCR

95°C	2min	Ciclo térmico
95°C	15seg	30ciclos
57°C	25seg	
72°C	40seg	
72°C	2min	
4°C	∞	

5.8 PREPARACIÓN DEL GEL DE AGAROSA

Se vierte en un matraz 100mL del tampón de electroforesis TBE y 1,00 g de agarosa (1,0 %). Luego, se funde la solución de agarosa en un microondas o placa calefactora y se deja enfriar la suspensión hasta que alcance unos 50°C aproximadamente. Se sella con cinta adhesiva el soporte donde se va a verter el gel de agarosa o se emplea un molde para éste y se coloca el peine que servirá para formar los pocillos del gel. Una vez que la solución de agarosa se ha solidificado, se emplea un ADN marcador denominado comúnmente como escalera que facilita determinar el tamaño del ADN desconocido. Luego, se preparan las muestras con el marcador GelRed (se toman 8µL de cada muestra y

2µL del tampón de carga o marcador) y se sirven en cada uno de los pozos teniendo en cuenta en cual pozo va a ir cada muestra. Finalmente, se realiza la conexión de los electrodos asegurándose de que el polo negativo quede en la parte inferior donde está la muestra y el polo positivo en la parte superior para que se logre arrastrar el ADN gracias a su carga negativa y el campo generado por la matriz de agarosa.

5.9 ANÁLISIS DE SECUENCIA

La búsqueda de homología de las secuencias también estuvo a cargo de Macrogen, se llevó a cabo utilizando BLAST de NCBI. Las secuencias con coincidencias significativas en las bases de datos del NCBI fueron traducidas en todos los posibles marcos de lectura y se determinó cual era la más acertada. Además, realizamos una doble verificación a partir de las secuencias proporcionadas por la entidad.

5.10 MANTENIMIENTO DEL VIRUS E INFECCIÓN DE MOSQUITOS

Las células C6/36 HT (obtenidas de las larvas de *Aedes albopictus*) fueron infectadas con virus Dengue-2, incubadas durante 14 días a 31°C en medio L15 suplementado con suero fetal bovino al 2% inactivado con calor, penicilina/estreptomicina al 1% y 1% de L-glutamina. El virus y células fueron colectados en un tubo para centrifuga de 15mL y se alicuotaron antes y después de la infección para valorar la cantidad del virus.

Para medir la competencia vectorial con y sin antibiótico se obtuvieron dos grupos de mosquitos. El primero consistió en 60 hembras (adultas recién emergidas) de la cepa susceptible y 60 de la cepa refractaria, que fueron alimentadas por 10 días con antibiótico (100ppm de penicilina- 100ppm de estreptomicina, 75ppm de gentamicina y 40ppm de metronidazol preparados en solución de azúcar al 10%). El segundo consistió en 60 hembras (adultas recién emergidas) de cada cepa alimentadas con solución de azúcar al 10% por diez días. Al onceavo día los dos grupos de mosquitos fueron alimentados con sangre artificial (mezcla de sangre de conejo defibrinada con la suspensión de virus dengue-2 en una proporción 1:1 v/v), empleando el intestino del cerdo como membrana en un alimentador como se muestra en la figura 3. Luego, se separaron los mosquitos llenos de sangre (abdomen oscuro) y se mantuvieron en jaulas separadas con acceso al antibiótico por 15 días o agua azucarada según correspondiera, para garantizar la replicación del virus dentro del mosquito. Todos estos experimentos se realizaron en un laboratorio con nivel de bioseguridad tipo II.



Figura. 3. Alimentación de mosquitos con sangre + virus

5.11 DETECCIÓN DEL VIRUS Y MEDICIÓN DE LA COMPETENCIA VECTORIAL

Con el fin de evaluar la competencia vectorial en cada una de las cepas tras la estandarización del antibiótico se empleó la técnica de inmunofluorescencia indirecta. Para esto, después del período de incubación del virus en el mosquito (15 días), se realizó la disección de las cabezas de los mosquitos infectados y se guardó el cuerpo rotulado adecuadamente. Dicha disección se realizó en un portaobjetos con una pinza adecuada y posteriormente se transfirieron a otro más limpio, donde se organizaron varias cabezas que fueron aplastadas con un cubre objetos y se fijaron en solución de acetona-PBS (3:1), cada una de las placas por 30min. Seguidamente se realizaron unos pozos alrededor de las muestras con ayuda de un marcador gráfico y se esperó hasta que secaran, luego se le adicionó a cada pozo 40 μ L de anticuerpo dengue-2 - PBS (1:150) y se puso en una cámara de humedad y se incubaron a 37°C por 45min. Después, se realizaron dos lavados con PBS y uno con agua purificada. Una vez realizado esto, se dejaron secar los pozos y se les añadió el fluorocromo (Fluoresceinisothiocyanate, FITC) junto con el azul de Evans en PBS (1:1:200), para marcar el anticuerpo y se realizó el mismo procedimiento de incubación y de lavado. Después, se observó en el microscopio de fluorescencia y se determinó el número de cabezas positivas (con fluorescencia) y las negativas (sin fluorescencia). Posteriormente se disectaron los intestinos medios de los mosquitos que no presentaron infección en las cabezas, con el fin de determinar si los intestinos si se infectan (barrera de escape) o si no se infectan (barrera de escape de intestino medio). Esto con el fin de identificar si el virus infecta el tejido y las barreras de infección. Se realizó el mismo procedimiento de inmunofluorescencia descrito anteriormente.

6. RESULTADOS

6.1 VERIFICACIÓN DE LAS CONDICIONES DEL MEDIO AMBIENTE PARA LA POSTERIOR DETECCIÓN DE BACTERIAS

Llevado a cabo el procedimiento descrito en la metodología del ítem 5.2, donde se emplearon ocho cajas de Petri con agar LB, una se empleó para el control de ambiente, seis de ellas para la siembra individual de los seis intestinos de la cepa Rockefeller y la última se empleó para el control negativo (PBS estéril). Parte de estas placas se fraccionaron en un 30% al momento de sembrar, es decir, cuando se adicionaron las perlas para dispersar la muestra en toda la caja de Petri, el agar LB no estaba consistente y comenzó a segmentarse. Una vez realizada la siembra de estas muestras se dejaron por un periodo de 48h a temperatura ambiente. Luego de este tiempo, se obtuvo que a pesar de cumplir adecuadamente con el protocolo de desinfección anteriormente mencionado, en la placa del control del ambiente se observó la presencia de un hongo y algunas colonias de bacterias que no se presentaban y/o evidenciaban dentro de las cajas donde fueron sembradas las muestras.

Estos resultados permitieron inferir que el medio ambiente del área de trabajo estaba contaminado, pero que si se garantizaba el proceso de desinfección del área, el uso del mechero durante todo el procedimiento, especialmente para transferir el intestino al tubo eppendorf donde estaba el PBS estéril previamente servido en cabina de flujo laminar; se podría realizar una adecuada detección de bacterias, ya que la erradicación del hongo presente en el ambiente requería el traslado del laboratorio y no se contaba con un área disponible para realizar este proceso (ver anexo 1).

6.2 EVALUACIÓN DE LA EXISTENCIA DE BACTERIAS PRESENTES EN EL INTESTINO MEDIO DE *Aedes aegypti* DE LAS CEPAS SUSCEPTIBLE Y REFRACTARIA AL VIRUS DENGUE

Una vez estandarizado el proceso de disección y siembra del intestino medio, se procedió a determinar la presencia de las bacterias en el intestino medio de las cepas susceptible y refractaria del mosquito. Se evaluaron cinco intestinos por cepa para cada réplica (duplicado). Se evaluaron 2 tipos de diluciones y se contó en ambos procesos con una placa como control negativo (PBS estéril). En las primeras diluciones empleadas (1X, 1:10, 1:100, 1:1000), no se observó crecimiento en una de las réplicas realizadas para la cepa refractaria y en la otra réplica hubo un crecimiento pobre de bacterias sólo en las diluciones más

concentradas. En cambio para la cepa susceptible se observó crecimiento en las dos réplicas pero conservó el comportamiento de que en las diluciones más altas no había crecimiento. Sin embargo, en éste proceso se logró identificar una colonia de bacterias de color crema, redonda y con relieve poco pronunciado para ambas cepas. También, se encontró una bacteria de color crema y en su centro un núcleo de color amarillo intenso para ambas cepas y una bacteria característica de la cepa susceptible con un halo difuso de color blanco tenue y un núcleo de color crema, que no se presentó en la cepa refractaria (figura 4).

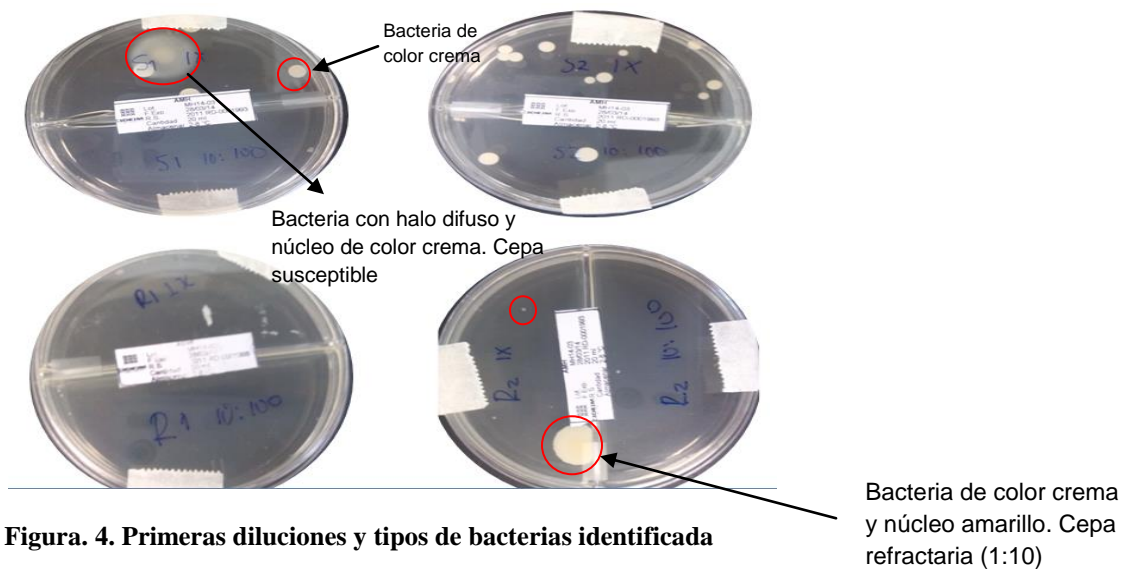


Figura. 4. Primeras diluciones y tipos de bacterias identificada

Debido a que en este experimento no se logró apreciar la diferencia de la composición bacteriana entre ambas cepas (susceptible y refractaria al virus dengue-2) porque no hubo un buen crecimiento debido a las diluciones tan grandes ya mencionadas, se propusieron las segundas diluciones (1:10, 2:10 y 3:10). Para este, se realizó el procedimiento ya descrito en la metodología y se obtuvo un crecimiento más uniforme para ambas cepas, se observó una nueva colonia de bacterias de color beige para la cepa refractaria, persistió la presencia de una colonia de bacterias de color crema-amarillenta y en su centro un núcleo de color amarillo intenso para la ambas cepas y en la cepa susceptible una colonia de bacterias de color crema, redonda y con relieve poco pronunciado al igual que en el procedimiento anterior (Figura 5).

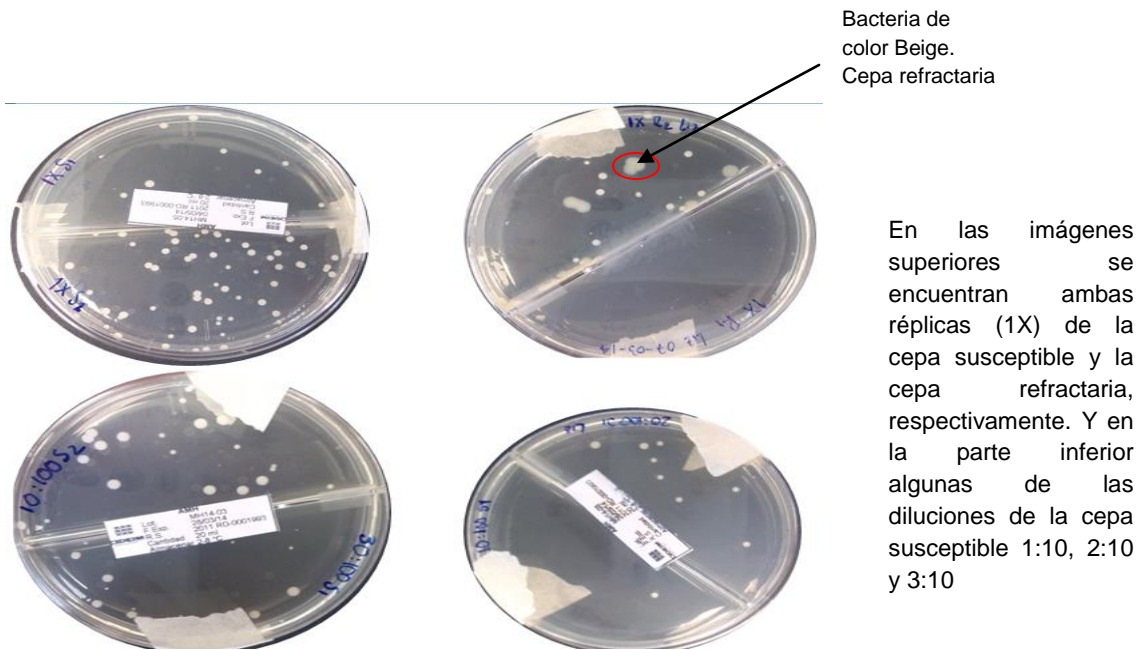


Figura. 5. Segundas diluciones y tipos de bacterias

Por otro lado, se realizó la evaluación de la existencia de bacterias anaerobias empleando el medio de tioglicolato. En este experimento sólo le logró verificar la presencia de bacterias anaerobias en ambas cepas a partir del crecimiento observado en este medio líquido como se puede ver en la figura 6.

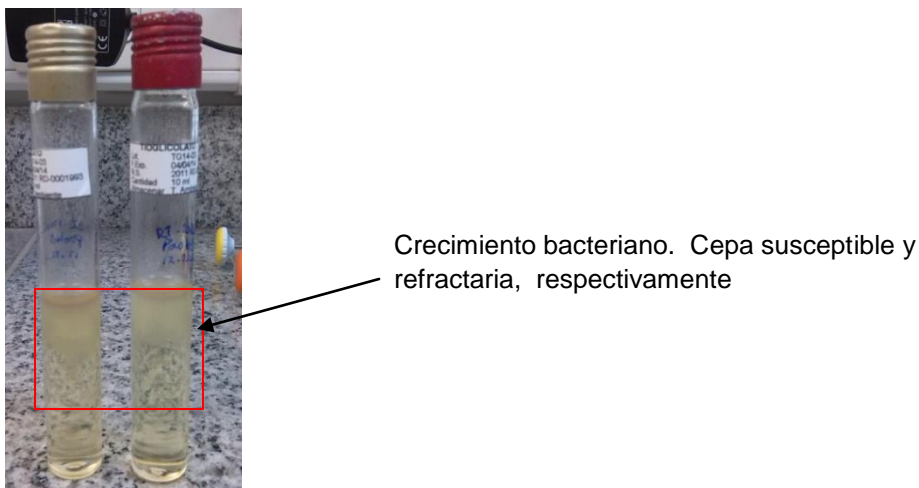


Figura. 6. Presencia de bacterias anaerobias en ambas cepas

Vale la pena aclarar que este proceso se realizó con el fin de identificar macroscópicamente los morfotipos de las colonias de bacterias presentes en el intestino medio del mosquito *Aedes aegypti* en ambas cepas y de apreciar su diferencia en dicha composición (bacterias aerobias). Sin embargo, de ésta

evaluación no se realizó el aislamiento de bacterias aerobias para su posterior amplificación e identificación.

6.3 ESTANDARIZACIÓN DEL ANTIBIÓTICO

Para la evaluación del tratamiento con antibiótico se expusieron 20 mosquitos por cepa para cada tratamiento.

En el primer experimento, los mosquitos se expusieron a un algodón con antibiótico preparado en agua ultra purificada estéril y otro con agua azucarada al 10% durante 5 días. Cuando se plaquearon los intestinos se observó que hubo crecimiento de bacterias. Posiblemente porque no se alimentaron del antibiótico o porque la concentración no era suficiente. Debido a esto, se realizó el tratamiento con las diferentes concentraciones de penicilina-estreptomicina y gentamicina preparado en el agua azucarada obteniéndose que la concentración óptima para eliminar las bacterias aerobias fue de 100ppm de penicilina como de estreptomicina y 75ppm de gentamicina (ver anexo 2). Sin embargo, como se contó con la limitación de que no habían mosquitos suficientes para realizar la réplica de cada concentración para la evaluación de bacterias aerobias y anaerobias, se repitió el procedimiento bajo las mismas condiciones, sólo para evaluar el efecto de los antibióticos en las bacterias anaerobias y se obtuvo que a concentraciones mayores, la penicilina-estreptomicina-gentamicina ejercían un efecto reductor pero resultaba tóxico para el mosquito tal como se muestra en la tabla 3 de longevidad, sobre todo para la cepa susceptible (ver anexo 3). A partir de los resultados en los que se evidenciaba que hubo un mayor porcentaje de mortalidad para la concentración de 100ppm de penicilina como de estreptomicina en la cepa susceptible que en la cepa refractaria, por lo cual se infiere que ese valor no sólo corresponde al efecto del antibiótico sino a otros factores asociados, por ejemplo: humedad, por falta de oxígeno, cambios bruscos en la temperatura, entre otros.

Tabla 3. Longevidad frente al tratamiento con penicilina-estreptomicina-gentamicina

Cepas	Concentración de penicilina-estreptomicina y 75ppm gentamicina	Días de tratamiento					%mortalidad
		1	2	3	4	5	
Susceptible	100 ppm	0	5	9	2	0	80
Mosquitos muertos	150 ppm	0	4	5	1	0	50

N=20 por tratamiento	200 ppm	0	1	6	1	0	40
Refractaria	100 ppm	0	0	0	0	0	0
Mosquitos muertos	150 ppm	0	0	0	0	0	0
N=20 por tratamiento	200 ppm	0	1	1	0	1	15

Gracias a que se observó una reducción de las bacterias anaerobias a altas concentraciones de antibiótico y que estas eran perjudiciales para los mosquitos, se introdujo el metronidazol que es específico para bacterias anaerobias y se realizaron dos experimentos adicionales. En el primero, se emplearon las concentraciones de 20ppm, 40ppm y 60ppm de metronidazol con la concentración definida para la penicilina-estreptomicina-gentamicina (P-S-G), donde se obtuvo que a la concentración más alta se presentaban efectos tóxicos en el mosquito como se muestra en la tabla 4 de longevidad. A partir de este se pudo determinar que el número de días de tratamiento no fue suficiente y que la concentración menos tóxica para el mosquito y más efectiva para las bacterias anaerobias fue de 40ppm (ver anexo 4).

Tabla 4. Longevidad frente al tratamiento con metronidazol

Cepas	Concentración de metronidazol más 100ppm de P-S y 75ppm de gentamicina	Días de tratamiento				%mortalidad
		1	2	3	4	
Susceptible Mosquitos muertos N=20 por tratamiento	20 ppm	0	0	0	0	0
	40 ppm	0	0	0	1	5
	60 ppm	0	0	0	3	15
Refractaria Mosquitos muertos N=20 por tratamiento	20 ppm	0	0	0	0	0
	40 ppm	0	0	0	0	0
	60 ppm	0	0	1	1	10

Por lo cual en el segundo ensayo, se realizó un tratamiento por cinco días con la concentración de 40ppm y observó una gran reducción de la flora bacteriana anaerobia, presentándose además en las placas de Mueller Hinton un crecimiento de levaduras más no de bacterias, por lo cual se pudo afirmar que el tratamiento fue el apropiado.

Nota: no se realizó tabla de mortalidad para mosquitos sin tratamiento ya que ningún mosquito murió.

6.4 DETERMINACIÓN DEL CRECIMIENTO DE LEVADURAS

Como se mencionó en la metodología se realizaron tres ensayos para determinar qué promovía el crecimiento de levaduras. En el primer ensayo donde se realizó la variación en el protocolo de desinfección, se observó un comportamiento bastante atípico, en la placa de la cepa susceptible donde el intestino había sido expuesto por dos minutos en etanol antes de transferir el intestino al PBS estéril presentó mayor crecimiento bacteriano que en la placa del intestino de la misma cepa que se había enjuagado por 30s en etanol. En cambio en la cepa refractaria se observó el comportamiento inverso (ver anexo 5).

Por otra parte, en el ensayo en el cual se tomaron mosquitos tratados con antibiótico y tratados sin antibiótico de ambas cepas, en todas las placas se observó crecimiento de levaduras. Además, se notó la presencia de un hongo que de igual manera se evidenció en el control negativo, lo cual indicó que el PBS en el cual se realizó el macerado estaba contaminado (ver anexo 5).

Por último, en el ensayo donde se evaluó si el agua azucarada promovía el crecimiento de levaduras se observó dicho crecimiento en la placa de la cepa refractaria tratada con antibiótico pero en la cepa susceptible tratada con antibiótico y en la placa del agua azucarada no se observó. Debido a que en los ensayos se evidenció el crecimiento de levaduras, se logró identificar que dicho crecimiento se debía a la temperatura de incubación, pues se estaba empleando 30°C que era la temperatura recomendada en los diferentes artículos. Sin embargo, se ha reportado que la temperatura óptima de crecimiento para bacterias está entre 35-37°C y temperaturas por debajo no sólo retardan el crecimiento de éstas sino que favorecen el crecimiento de levaduras (ver anexo 5).

6.5 IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE BACTERIAS

En el proceso de identificación se realizaron dos tinciones de Gram a todas las muestras catalogadas por morfología como bacterias. Dichas muestras fueron tomadas del proceso de determinación del crecimiento de levaduras (variación del protocolo de desinfección) y unas placas almacenadas del proceso de estandarización del antibiótico en las cuales el tratamiento no fue efectivo, y se encontró que eran bacilos Gram-negativos. Por otra parte, en el proceso de identificación realizado por el departamento de resistencia bacteriana de CIDEIM, empleando el MALDITOF se encontró que existía un solo tipo de bacteria perteneciente a la cepa refractaria (tomada del primer ensayo del tratamiento con antibiótico), *Pseudomonas stutzeri*, que efectivamente corresponde a un bacilo Gram negativo. También, se corroboró que los otros tipos de crecimiento eran levaduras de acuerdo a los resultados proporcionados (ver tabla 5) y que éstas a su vez, no están exentas de la tinción de Gram, es decir, dicha tinción también genera un color en las levaduras dependiendo de la composición de su pared celular pero ante el microscopio presentan un mayor tamaño en comparación con las bacterias (ver figura 7).

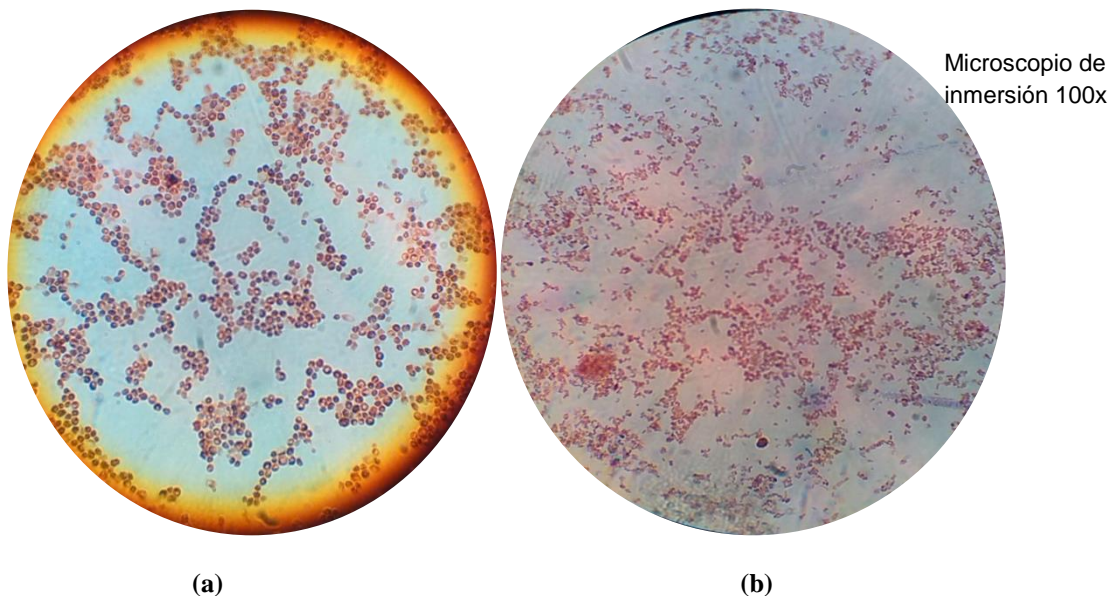


Figura. 7. a) Tinción de Gram de levaduras b) tinción de Gram bacterias

Sin embargo, con el fin de dar cumplimiento a la metodología propuesta en el anteproyecto y proporcionar resultados más certeros acerca del tipo de bacterias identificadas, se realizó un proceso de extracción de ADN de cinco colonias identificadas por tinción de Gram y tomadas de las placas almacenadas del proceso de estandarización del antibiótico a las concentraciones que no fueron efectivas, del proceso de determinación del crecimiento de levaduras y de una

siembra que se realizó simultáneamente, con el fin de realizar el aislamiento de bacterias. En la extracción se pudo corroborar la presencia de ácidos nucleicos en cada una de las muestras por medio del NANODROP y se obtuvo la cuantificación de los mismos (ver tabla 6). Para la identificación de bacterias, se realizó una amplificación del gen 16S de dichas bacterias. En dos de los cinco amplificados se observó la misma banda que en el control negativo (mix de PCR). Debido a los resultados obtenidos, se preparó de nuevo el mix y se realizó de nuevo la PCR para corroborar que no había sido un error experimental pero se obtuvo el mismo resultado sugiriendo que alguno de los reactivos estaba contaminado.

Afortunadamente la entidad (MACROGEN) sólo requirió las muestras obtenidas en la extracción (ADN). Ésta se encargó de realizar las respectivas reacciones para la secuenciación y proporcionó los resultados evidenciados en la tabla 7. A parte de identificar la secuencia de cada muestra, se encargó de emplear la herramienta BLAST del NCBI para la homología de las secuencias y determinar el tipo de bacteria. La cual se verificó una segunda vez a partir de las secuencias proporcionadas. De éstos resultados solo se pudieron identificar como bacterias la *Dietzia papillomatosis*, *Aeromonas sp*, *Microbacterium sp* y *Propionibacterium acnés*. Sin embargo, ésta última se considera que fue producto de contaminación debido a que es propia de los seres humanos por ser la responsable de la aparición de acné.

Tabla 5. Resultados del MALDITOF

# Colonia X duplicado	Cepa / tomadas de las placas	Identificación	Porcentaje de confianza
1	Cepa susceptible	No identificado como bacteria	
1	Cepa susceptible	No identificado como Levadura	
2	Cepa susceptible	<i>Candida parasilopsis</i>	98.1
2	Cepa susceptible	<i>Candida parasilopsis</i>	97.0
3	Cepa refractaria, primer tratamiento con antibiótico	No identificado como Bacteria	
3	Cepa refractaria, primer tratamiento con antibiótico	No identificado como Levadura	
4	Cepa refractaria, primer tratamiento con antibiótico	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	99.9
4	Cepa refractaria, primer tratamiento con antibiótico	No identificado como Levadura	
5	Cepa refractaria, primer tratamiento con antibiótico	No identificado como Levadura	
5	Cepa refractaria, primer tratamiento con antibiótico	<i>Candida parasilopsis</i>	80.1
6	Cepa susceptible, variación en el protocolo de desinfección	No identificado como Bacteria	

6	Cepa susceptible, variación en el protocolo de desinfección etanol 2min	No identificado como Bacteria	
7	Cepa susceptible, variación en el protocolo de desinfección (protocolo regular)	No identificado como Bacteria	
7	Cepa susceptible, variación en el protocolo de desinfección (protocolo regular)	No identificado como Bacteria	
8	Cepa refractaria. Aislamiento	<i>Candida pelliculosa</i>	99.9
8	Cepa refractaria. Aislamiento		99.9
9	Cepa susceptible. Aislamiento	<i>Candida guilliermondii</i>	97.3
9	Cepa susceptible. Aislamiento	No ID para Levadura	

Tabla 6. Cuantificación del ADN (NANODROP)

Muestra	ng/uL
1 cepa susceptible	417,31
2 cepa susceptible	1609,67
3 cepa refractaria	9,93
4 cepa refractaria	1046,53
5 cepa refractaria	74,17

Tabla 7. Resultados de secuenciación (BLAST)

Name	Subject		Identities			
	Gene	Ref.	Length	Match	Total	Pct. (%)
1 Cepa susceptible	<i>Aeromonas sp.</i> T9 16S ribosomal RNA, partial sequence	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/635200830?report=genbank&log\$=nuclalign&blast_rank=1&RID=0	1535	748	750	99
2 Cepa susceptible	Hypothetical protein [<i>Propionibacterium acnes</i>]	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/488498836?report=genbank&log\$=protalign&blast_rank=1&RID=0	105	89	105	85
3 Cepa refractaria	<i>Dietzia papillomatosis</i> strain N 1280 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/636560627?report=genbank&log\$=nuclalign&blast_rank=1&RID=0	1437	1047	1106	95
4 Cepa refractaria	Uncultured bacterium clone Fec256 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/237687679?report=genbank&log\$=nuclalign&blast_rank=1&RID=0	723	172	195	88

5 Cepa refractaria	<i>Microbacterium</i> sp. 10I 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/515473911?report=genbank&log\$=nuclalig n&blast_rank=1&RID=0	1365	726		919	79
-----------------------	--	---	------	-----	--	-----	----

6.6 MEDICIÓN DE LA COMPETENCIA VECTORIAL

Al final de proceso de alimentación de sangre más virus realizado para ambas cepas con tratamiento y sin tratamiento de antibiótico (solución de azúcar al 10%) por una hora y media, sólo se alimentaron de sangre más virus 25 individuos de la cepa refractaria tratados con antibiótico y dos individuos de la cepa susceptible sin tratamiento; lo que quiere decir, que la cepa refractaria sin tratamiento y la cepa susceptible con tratamiento no se alimentó por lo cual no logró infectarse. Seguidamente, se realizó visualmente dicha selección de los mosquitos alimentados de los no alimentados, identificando y separando en distintas jaulas, los mosquitos que tenían el abdomen más oscuro (con sangre) de aquellos con abdomen traslúcido. Los grupos de mosquitos que no se alimentaron con sangre más virus no se pudieron evaluar, por lo tanto no se trabajó con el grupo de la cepa susceptible.

A los 15 días, donde se garantizaba que el virus se replicara en el mosquito, se realizó el proceso de inmunofluorescencia a 23 de los 25 mosquitos **de la cepa refractaria** con tratamiento con antibiótico y alimentados con sangre, ya que dos de ellos murieron. Por otra parte, a los dos individuos de la cepa susceptible sin tratamiento que se alimentaron de sangre no se les realizó el procedimiento porque no se consideró una muestra representativa.

Los resultados de la inmunofluorescencia realizada en cabeza a la cepa refractaria con tratamiento revelan que el 13% (3 cabezas positivas de 23 cabezas evaluadas) de los mosquitos alimentados con sangre más virus, alcanzaron a infectar las glándulas salivales de mosquito, lo que indica que son susceptibles al virus dengue-2. El porcentaje restante de estos fueron negativos en cabeza, lo cual indica que probablemente pudo haber infectado el intestino medio pero no alcanzó glándulas salivales, es decir, que presenta una barrera de escape de intestino medio (BEM) o que no infectó el intestino, es decir, que presenta una barrera de infección de intestino medio (BIM). Por lo anterior, a este porcentaje restante se les realizó el proceso de IFI (inmunofluorescencia) en intestino descrito en la metodología. Sin embargo, por motivos de errores en el procedimiento se perdió muestra y sólo se pudo evaluar la competencia vectorial en sólo ocho de los individuos que fueron negativos a la infección en cabeza, obteniéndose que el

37,5% (3 intestinos positivos de 8 intestinos evaluados) alcanzaron a infectar el intestino medio y por lo tanto, son mosquitos refractarios con barrera de escape de intestino medio (BEM) y el 62,5% presentan un fenotipo de mosquitos refractarios con barrera de infección de intestino medio (BIM). Finalmente, como no se cuenta con un control de la cepa refractaria, es decir, mosquitos refractarios sin tratamiento alimentados con sangre más virus, no se puede realizar una comparación del efecto de las bacterias en su competencia vectorial.

Los resultados obtenidos con la cepa refractaria se compararon con estudios previos de competencia vectorial realizados anteriormente en CIDEIM, cuyo porcentaje esperado de susceptibilidad es 17% (cabezas positivas) y del fenotipo de mosquitos refractarios con barrera de infección de intestino medio de 48%. Se observa que no hubo mayores cambios en los fenotipos esperados en mosquitos sin bacterias, por lo cual se infiere que no existe una variación significativa en la competencia vectorial. Por lo cual, se recomienda realizar el experimento nuevamente para confirmar los resultados del ensayo preliminar. En lo relacionado con la longevidad, se realizó la medición de esta durante el tratamiento con antibiótico por diez días realizado antes de la infección y se obtuvo que ningún mosquito murió, pero frente a la infección con el virus dengue-2, al segundo día se registró el 8% de mortalidad, es decir, 2 de los 25 mosquitos infectados de la cepa refractaria con tratamiento murieron.

Nota: Sólo ingirieron sangre más virus 25 mosquitos de la cepa refractaria tratados con antibiótico y dos mosquitos de la cepa susceptible sin tratamiento (que fueron descartados). Los mosquitos de la cepa refractaria sin tratamiento y los mosquitos de la cepa susceptible con tratamiento no se alimentaron.

7. ANÁLISIS DE RESULTADOS

El análisis de resultados se llevó a cabo teniendo en cuenta los aspectos encontrados y las propuestas de solución definidas para los problemas presentados durante el transcurso del proceso.

A continuación se describen los aspectos relevantes encontrados:

Del proceso de estandarización de la metodología del manejo del medio ambiente, se infirió que el uso de cabina de flujo laminar, el uso del mechero y la adecuada desinfección del área en su totalidad, son indispensables para la garantizar la detección de bacterias sin que se presenten sesgos en la información. Además, la consistencia y el tipo de agar empleado, son de gran importancia al momento de determinar la presencia de bacterias y su posterior aislamiento.

Por otra parte, a partir del proceso de estandarización del antibiótico realizado en CIDEIM, se determinó que la concentración de los antibióticos que dio mejor resultado fue la de 100ppm de penicilina-100ppm de estreptomina-75ppm de gentamicina y 40ppm de metronidazol.

Se empleó la penicilina ya que fue la reportada por diferentes artículos y fundamentalmente porque actúa inhibiendo la síntesis de la pared celular de la bacteria. Además, en aquellas bacterias que contienen en su pared celular peptidoglicano, al inhibir ciertas enzimas, impide el desarrollo estructural normal de peptidoglicano creándose así, una pared defectuosa que desprotege a la bacteria y fácilmente induce la lisis celular del microorganismo (Dpto ciencias fisiológicas, 2014). Además presenta un amplio espectro y es usada tanto para bacterias Gram positivas como para bacterias Gram negativas; sin embargo, su relevancia se debe a que los bacilos Gram negativos que son los más encontrados en el intestino medio del *Aedes*, según (Ramirez J, et al, 2012), por poseer una capa muy fina de peptidoglucano, con enlaces cruzados débiles, son susceptibles al efecto de éste antibiótico (Lozano, D et al, 1998).

Con el fin de potenciar el efecto, especialmente en bacterias aerobias se emplearon dos antibióticos pertenecientes al grupo de los aminoglucósidos. El primero fue la estreptomina, un tipo de antibiótico que actúa a nivel ribosomal inhibiendo la síntesis proteica en la subunidad pequeña del ribosoma (subunidad 30S), de forma que impide que se forme el complejo de iniciación de la síntesis proteica (Ecured, 2014). Su asociación con la penicilina ofrece un efecto sinérgico, que amplifica el espectro de acción y potencia el efecto de ambos

antibióticos. El segundo fue la gentamicina, un aminoglucósido bactericida que actúa de manera similar a la estreptomina pero se pliega a las subunidades 30s y 50s (Vademecum, 2014).

También, se realizó la inclusión del metronidazol con el fin de evaluar la importancia de las bacterias anaerobias en la competencia vectorial, que se ha venido discriminando en los diferentes estudios previamente realizados. Este actúa sobre las proteínas que transportan electrones en la cadena respiratoria de las bacterias anaerobias, mientras que en otros microorganismos se introduce entre las cadenas de ADN inhibiendo la síntesis de ácidos nucleicos. Es muy eficaz como antimicrobiano, y prácticamente no induce resistencias. Además es conocido como el medicamento más efectivo para el tratamiento de bacterias anaerobias (Vademecum, 2014).

Una vez realizada la estandarización del antibiótico y encontrada la razón por la cual existía un crecimiento de levaduras, se realizó el aislamiento de cinco colonias de bacterias obtenidas en algunos de estos estudios previos. En una etapa inicial se pudo determinar morfológicamente que el crecimiento en ambas cepas era diferente y posteriormente, al momento de realizar la identificación de la composición bacteriana empleando la técnica de secuenciación y el MALDITOF como un soporte adicional, se encontró en la cepa refractaria la presencia de *Pseudomonas stutzeri*, *Microbacterium sp* y *Dietzia papillomatosis*, de las cuales sólo las dos primeras se encuentran reportadas en los estudios previos de identificación de la microbiota presente en el intestino medio del *Aedes aegypti* (referenciadas en el marco teórico).

Por otra parte, se encontró en la cepa susceptible la bacteria *Propionibacterium acnes* y *Aeromonas sp* (referenciada en el marco teórico). La primera, es una bacteria propia de los seres humanos y está asociada a la producción de acné, por lo cual se cree que es producto de contaminación y la segunda, ya se ha sido reportada en estudios previos de identificación de la composición bacteriana. Por lo cual, para la cepa susceptible sólo fue posible identificar un solo tipo de bacteria ya que en el procedimiento realizado por el MALDITOF sólo se reportaron levaduras y en la identificación realizada a partir de las secuencias proporcionadas, se contó con la bacteria producto de contaminación y la bacteria *Aeromonas sp*.

Finalmente, se evaluó la competencia vectorial a partir de 23 de los 25 individuos de la cepa refractaria con tratamiento que se logró alimentar con sangre más virus. Sin embargo, durante la realización de éste procedimiento se presentaron varias

limitantes como lo fueron: la presencia de hormigas en el laboratorio que impedía la obtención de los mosquitos; que los mosquitos no se alimentaran a pesar de que se realizaran dos intentos de infección los cuales presentaron el mismo comportamiento pero que por cuestiones de tiempo, la segunda infección no se siguió realizando. Otro de los problemas presentados fue que una vez garantizada la alimentación de sólo la cepa refractaria tratada con antibiótico, no se contó con el control para la medición de la competencia vectorial. Es decir, que la cepa refractaria sin tratamiento tampoco se alimentó con la sangre infectada. Por último, se tuvo que tras el proceso de aprendizaje de la técnica de IFI, una de las placas no fue viable ya que el proceso de inmunofluorescencia no se realizó adecuadamente y por eso no se pudo observar en el microscopio de fluorescencia. Por ende, ésta muestra tan poco representativa sólo sirvió para estimar un porcentaje general de los mosquitos refractarios que alcanzaron a infectar el intestino medio del mosquito y los cuales no cuentan con la Barrera de Infección de Intestino medio.

Por lo anterior, la comparación del efecto de las bacterias en la competencia vectorial a falta del control, se realizó a partir de estudios previos realizados en CIDEIM, obteniéndose que el porcentaje esperado de mosquitos refractarios con fenotipo de Barrera de Infección de Intestino medio era de 48% y cambió en este estudio a 62,5%.

A manera de conclusión, el largo proceso de estandarización del antibiótico, la falta de material biológico y los diferentes obstáculos presentados durante el trabajo, no permitió dar cumplimiento al objetivo específico y mucho menos al objetivo general pero se considera que este estudio brinda herramientas suficientes para posteriores investigaciones.

8. CONCLUSIONES

- Trabajar con organismos vivos requiere de tiempo y no es algo que pueda predecirse.
- El medio empleado fue óptimo para determinar la existencia de bacterias anaerobias en el intestino medio de *Aedes aegypti*
- Es necesario realizar todo experimento por duplicado para evitar sesgos en la información
- El metronidazol es efectivo para bacterias anaerobias y el tratamiento con antibiótico requiere como mínimo cinco a seis días para garantizar su efectividad.
- La mayoría de bacterias presentes en el intestino medio del mosquito hembra de *Aedes aegypti* son Gram negativas.
- La temperatura óptima de incubación para bacterias es de 35-37°C.
- A pesar de las limitaciones de tiempo y demás, se logró dar cumplimiento a uno de los objetivos específicos propuestos en el anteproyecto.
- Se aportó al conocimiento sobre los procedimientos necesarios para realizar la evaluación del efecto de la composición bacteriana del intestino medio del mosquito hembra en la competencia vectorial.

9. RECOMENDACIONES

- Una vez realizado el proceso de estandarización de los antibióticos a emplear, recoger suficiente muestra biológica para proseguir con experimentos futuros.
- Adecuar el área en la cual se va a trabajar con bacterias de tal forma que no haya lugar a contaminación.
- Tomar medidas con la presencia de hormigas antes de comenzar un proyecto.
- Analizar otro tipo de agar para el crecimiento de bacterias aerobias.
- Tener presente y considerar las temperaturas óptimas que se reportan en los diferentes artículos para el crecimiento bacteriano.

10. BIBLIOGRAFÍA

Acosta-Bas B, Gómez I. (2005). *Biología y métodos diagnósticos*. Recuperado el junio de 2014, de <http://www.revbiomed.uady.mx/pdf/rb051626.pdf>

Apte-Deshpande, A., Paingankar, M., Gokhale, M. D., & Deobagkar, D. N. (2012). *Serratia odorifera* a midgut inhabitant of *Aedes aegypti* mosquito enhances its susceptibility to dengue-2 virus. *PLoS One*, 7(7), e40401.

Ayres, C. F. J., Melo-santos, M. A. V., Solé-Cava, A. M., & Furtado, A. F. (2003). Genetic differentiation of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae), the major dengue vector in Brazil. *Journal of medical entomology*, 40(4), 430-435.

Barón, O. L., Ursic-Bedoya, R. J., Lowenberger, C. A., & Ocampo, C. B. (2010). Differential gene expression from midguts of refractory and susceptible lines of the mosquito, *Aedes aegypti*, infected with Dengue-2 virus. *Journal of Insect Science*, 10(41), 1-23.

Beaty, B. J., & Marquardt, W. C. (1996). *The biology of disease vectors*. University Press of Colorado.

Biología Sur. (09 de 12 de 2013). Obtenido de <http://www.biologiasur.org/secuenciacion-adn/88-secuenciacion-adn-soluciones.html>

Blumberg, B. J., Trop, S., Das, S., & Dimopoulos, G. (2013). Bacteria-and IMD pathway-independent immune defenses against *Plasmodium falciparum* in *Anopheles gambiae*. *PLoS One*, 8(9), e72130.

Caicedo, P. A., Baron, O. L., Pérez, M., Alexander, N., Lowenberger, C., & Ocampo, C. B. (2013). Selection of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) strains that are susceptible or refractory to Dengue-2 virus. *The Canadian Entomologist*, 145(03), 273-282.

Dpto ciencias fisiológicas. (2014). "*Penicilinas, Cefalosporinas y otros Betalactámicos*". Obtenido de <http://med.javeriana.edu.co/fisiologia/fw/c722.htm>

EcuRed. (22 de Noviembre de 2013). *Aedes aegypti*. Obtenido de http://www.ecured.cu/index.php/Aedes_aegypti

Ecured. (2014). *Estreptomycin*. Recuperado el 2014, de http://www.ecured.cu/index.php/Estreptomycin#Mecanismo_de_acci.C3.B3n

Feldhaar, H. (2011). Bacterial symbionts as mediators of ecologically important traits of insect hosts. *Ecological Entomology*, 36(5), 533-543.

Grisales, N., Poupardin, R., Gomez, S., Fonseca-Gonzalez, I., Ranson, H., & Lenhart, A. (2013). Temephos resistance in *Aedes aegypti* in Colombia compromises dengue vector control. *PLoS neglected tropical diseases*, 7(9), e2438.

Guillermo L. Rúa-Uribe; Suárez C; Rojo R. (2012). Implicaciones epidemiológicas de *Aedes albopictus* (Skuse) en Colombia. www.redalyc.org .

Gaio, A., Rodriguez, R., do Nascimento, C., Secundino, N., Lemos, F., Pimenta, P., Monesi, N. Use of the checkerboard ADN-ADN hybridization technique for bacteria detection in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) (L.)

INMUNOFLUORESCENCIA. (2014). Recuperado el 2014, de http://exa.unne.edu.ar/bioquimica/inmunoclinica/documentos/Laboratorio_TPN8.pdf

INS (2014). Boletín epidemiológico semana 2 (05 al 11 de enero). Recuperado el 29 de junio de 2014, de <http://www.ins.gov.co/boletin-epidemiologico/Boletn%20Epidemiologico/2014%20Boletin%20epidemiologico%20semana%2002.pdf>

INS. (2011). *Protocolo para la vigilancia en salud pública del dengue*. Recuperado el 22 de noviembre de 2013, de <http://www.ins.gov.co/temas-de-interes/Dengue/01%20Protocolo%20Dengue.pdf>

López, A., Bello, A., Díaz, A. (2010) *Estandarización de la técnica de RT-PCR para la amplificación de citocinas de ratones inmunizados*. Tesis de grado. 1-26

Lozano D, Larrondo H, Herrera M, Rivero E, Zamora R y Araújo L. (1998). *Penicilinas*. Acta médica, 8(1), 28-39

Ministerio de Salud. (2014). *DENGUE*. Recuperado el 2014, de <http://www.minsalud.gov.co/salud/publica/PET/Paginas/dengue.aspx>

nitzipper. (09 de 12 de 2013). Obtenido de <http://www.nitzipper.com/es/nitzipper-aplicaciones-bioconjugacion/inmunofluorescencia.html>

Ocampo, C. B., Caicedo, P. A., Jaramillo, G., Bedoya, R. U., Baron, O., Serrato, I. M., ...& Lowenberger, C. (2013). Differential expression of apoptosis related genes

in selected strains of *Aedes aegypti* with different susceptibilities to dengue virus. *PLoSone*, 8(4), e61187.

Oliveira ,J., Goncalves,R., Lara,F.,Dias,F., Gandara,A., Menna-Barreto,R., Edwards,M., Laurindo,F.,Silva-Neto,F.,Sorgine,M.,Oliveira,P. Blood Meal-Derived Heme Decreases ROS Levels in the Midgut of *Aedes aegypti* and Allows Proliferation of Intestinal Microbiota

OMS. (2009). *DENGUE GUIAS PARA EL DIAGNÓSTICO, TRATAMIENTO, PREVENCIÓN Y CONTROL*. Recuperado el 18 de noviembre de 2013, de http://whqlibdoc.who.int/publications/2009/9789995479213_spa.pdf

OMS. (2014). *Dengue y Dengue hemorrágico*. Recuperado el 2013, de <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/es/>

OMS. (02 de 011.). Nota descriptiva N° 194. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs194/es/index.html>.

OPS/OMS. (2010). Recuperado el 2013, de Guía de Atención Clínica Integral del Paciente con Dengue : <http://www.paho.org/>

Ramirez, J. L., Souza-Neto, J., Cosme, R. T., Rovira, J., Ortiz, A., Pascale, J. M., & Dimopoulos, G. (2012). Reciprocal tripartite interactions between the *Aedes aegypti* midgut microbiota, innate immune system and dengue virus influences vector competence. *PLoS neglected tropical diseases*, 6(3), e1561.

Pernalete, M., Fernández, Z., Rivera, M.,Zarzour, J., Ruiz, J. R., Rojas, E., Rubio-Palis, Y., Liprandi, F., & Herrera, F. (2008). Susceptibilidad a la infección oral por virus DEN-1 en poblaciones de *Aedes aegypti* de Venezuela. *Biología Molecular-Aedes aegypti*, 12 (suplemento 1), 45-57

Salazar, M. I., Richardson, J. H., Sánchez-Vargas, I., Olson, K. E., &Beaty, B. J. (2007). Dengue virus type 2: replication and tropisms in orally infected *Aedes aegypti* mosquitoes. *BMC microbiology*, 7(1), 9.

Sim, S., Ramirez, J. L., & Dimopoulos, G. (2012). Dengue virus infection of the *Aedes aegypti* salivary gland and chemosensory apparatus induces genes that modulate infection and blood-feeding behavior. *PLoS pathogens*, 8(3), e1002631.

Vademecum. (2014). *Mecanismo de acción*. Recuperado el 26 de Junio de 2014, de <http://www.vademecum.es/principios-activos-gentamicina-j01gb03>

Vademecum. (2014). *Metronidazol*. Recuperado el 26 de Junio de 2014, de <http://www.iqb.es/cbasicas/farma/farma04/m038.htm>

Velasco, J. (Junio de 2013). *Situación de Dengue en el Valle del Cauca a semana epidemiológica 25 de 2013*. Obtenido de http://190.6.160.68/dengue/Situacion_dengue_a_semana_25_de_2013.pdf

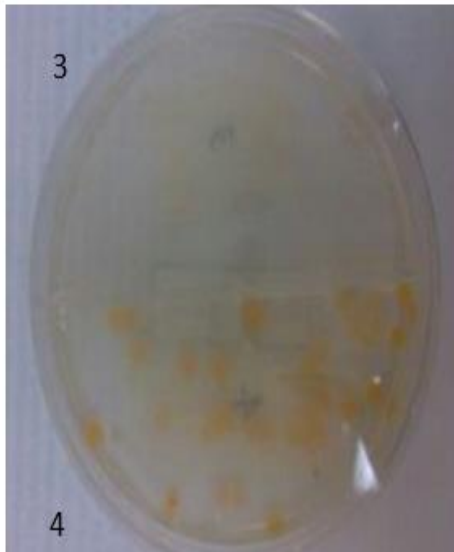
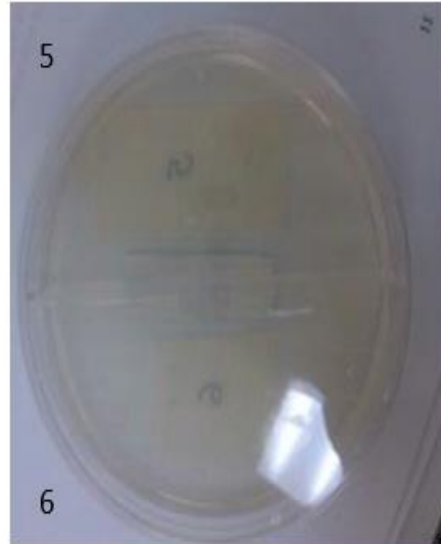
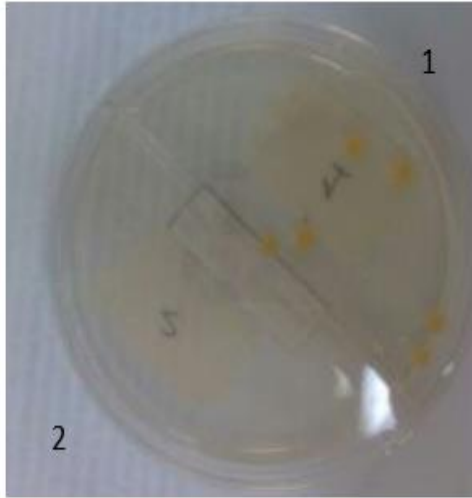
Xi, Z., Ramirez, J. L., & Dimopoulos, G. (2008). The *Aedes aegypti* toll pathway controls dengue virus infection. *PLoS Pathogens*, 4(7), e1000098.

Ye, Y., Woolfit, M., Rance, E., O'Neill, S., McGraw, E. *Wolbachia*-Associated Bacterial Protection in the Mosquito *Aedes aegypti*

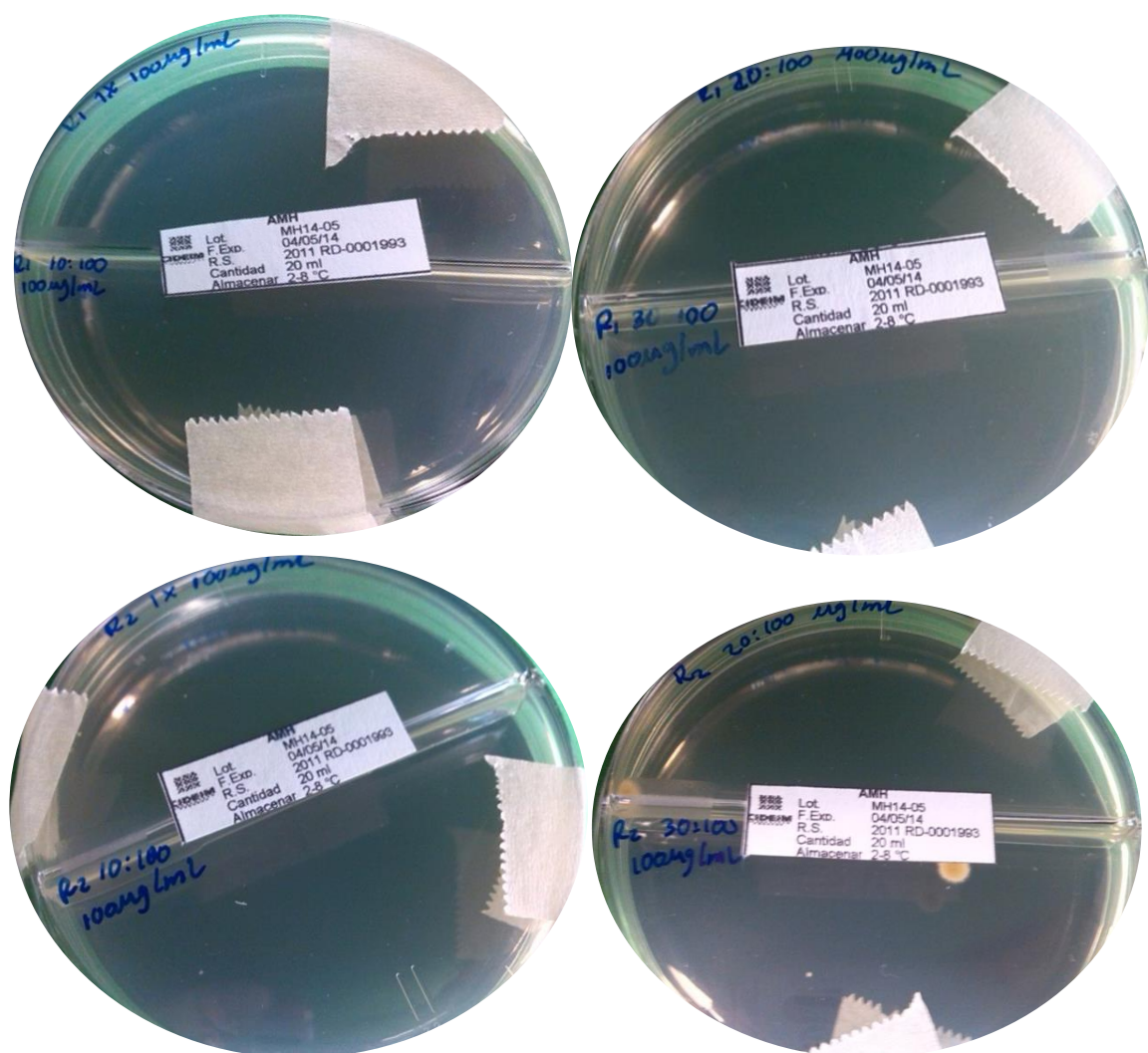
Zouache, K., Raharimalala, F. N., Raquin, V., Tran-Van, V., Raveloson, L. H. R., Ravelonandro, P., & Mavingui, P. (2011). Bacterial diversity of field-caught mosquitoes, *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti*, from different geographic regions of Madagascar. *FEMS microbiology ecology*, 75(3), 377-389.

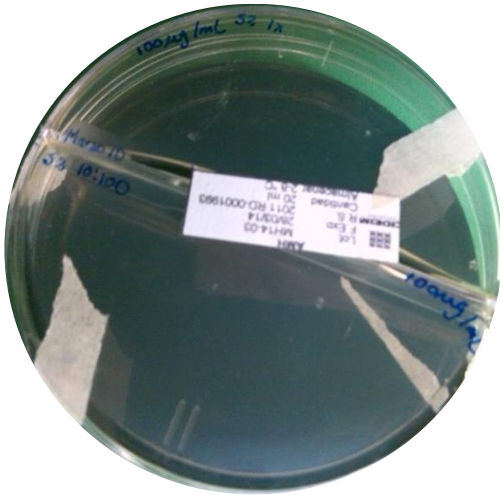
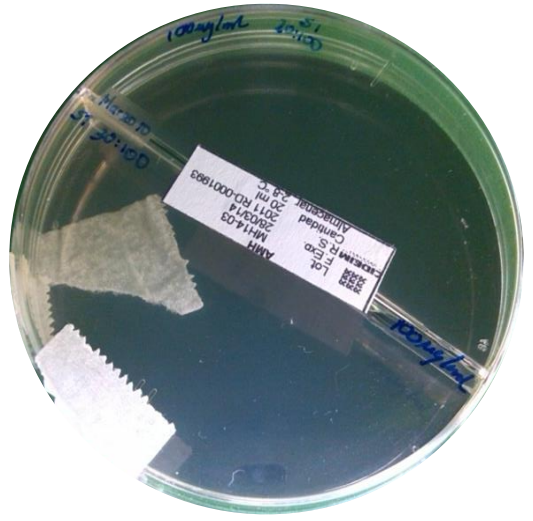
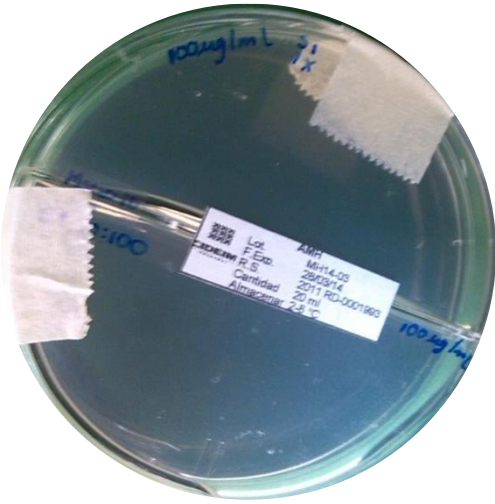
11. ANEXOS

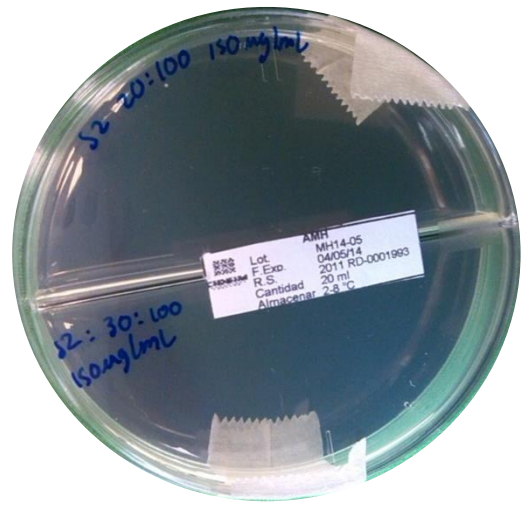
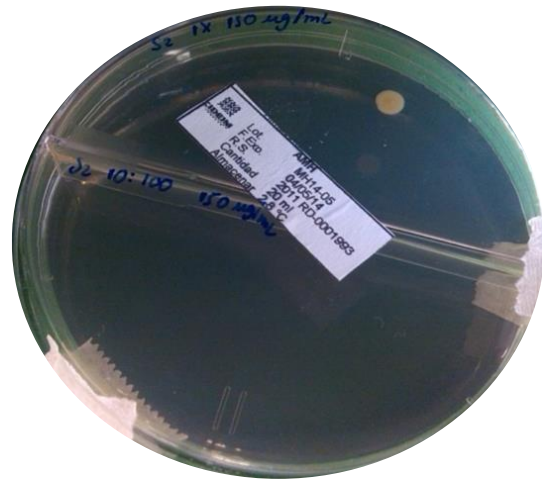
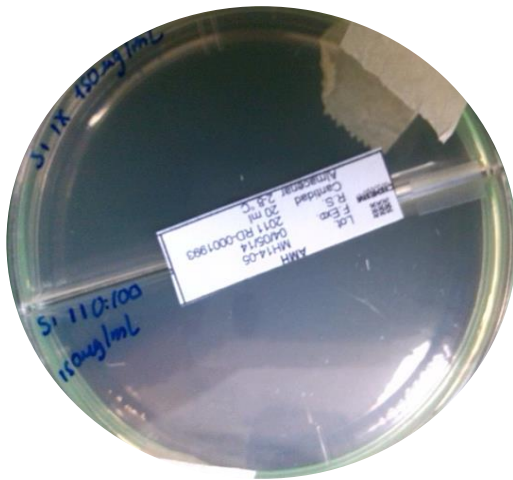
Anexo 1. Verificación de las condiciones del ambiente

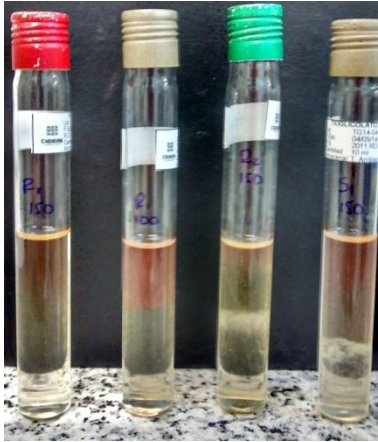


Anexo 2. Evaluación de la efectividad de las concentraciones de 100ppm, 150ppm y 200ppm de penicilina-estreptomicina y 75ppm de gentamicina, administradas al mosquito hembra para eliminar las bacterias del intestino medio









Anexo 4. Tratamiento con metronidazol 40 ppm

P-S: penicilina –estreptomicina

G: gentamicina

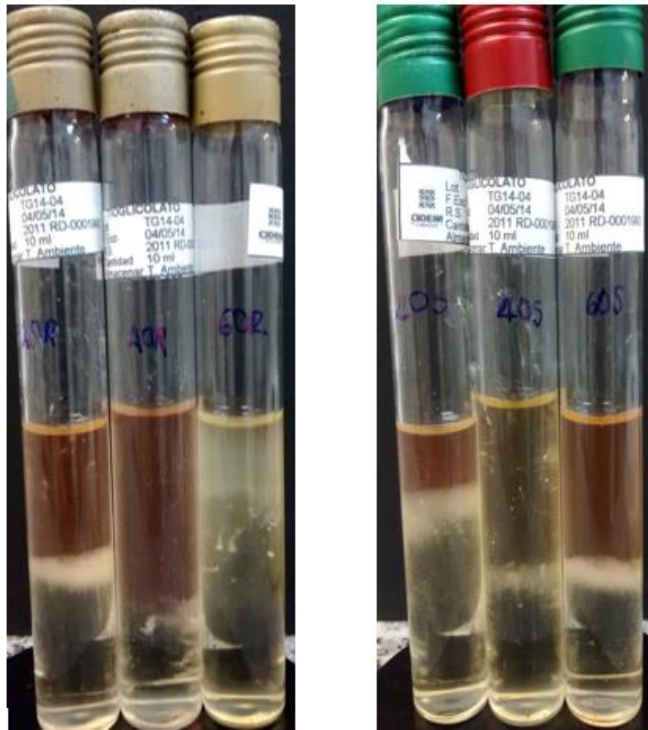
M: metronidazol

S: susceptible

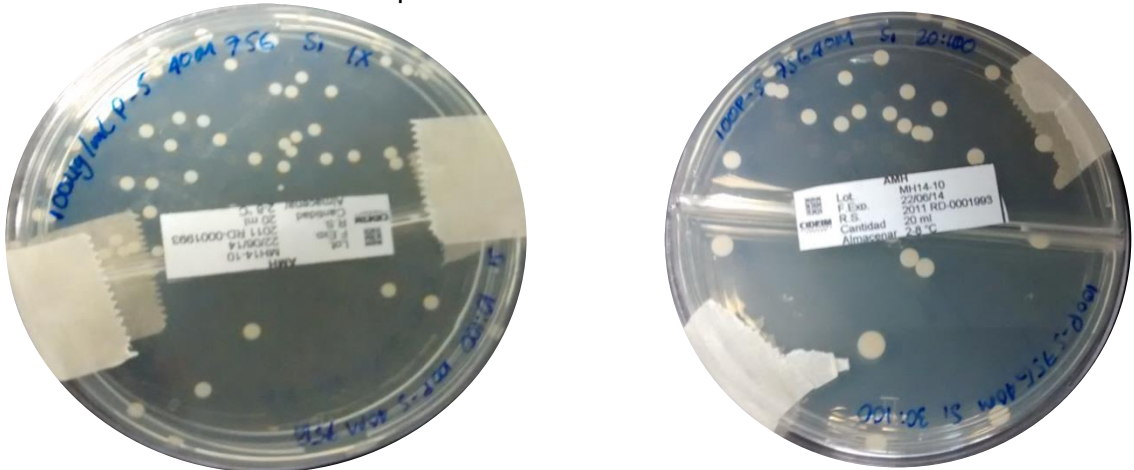
R: refractaria

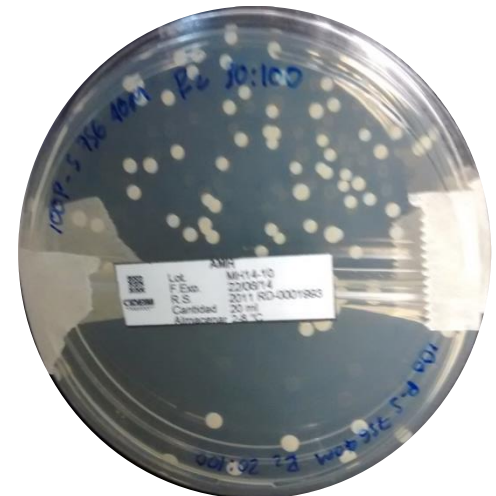
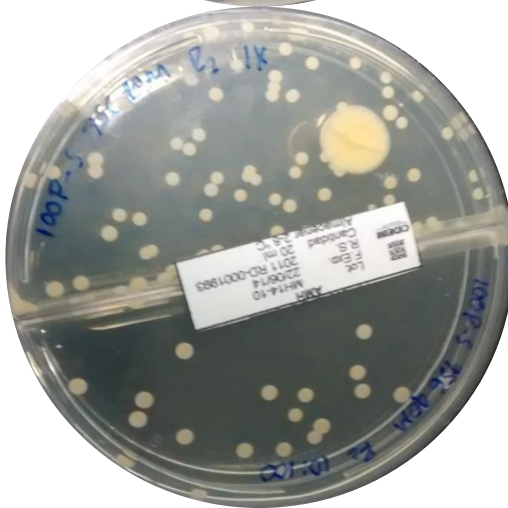
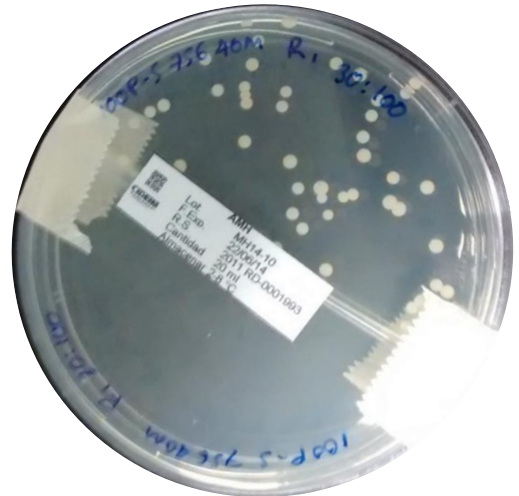
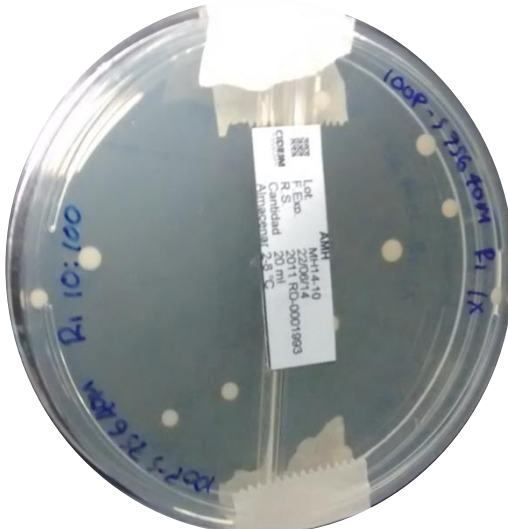
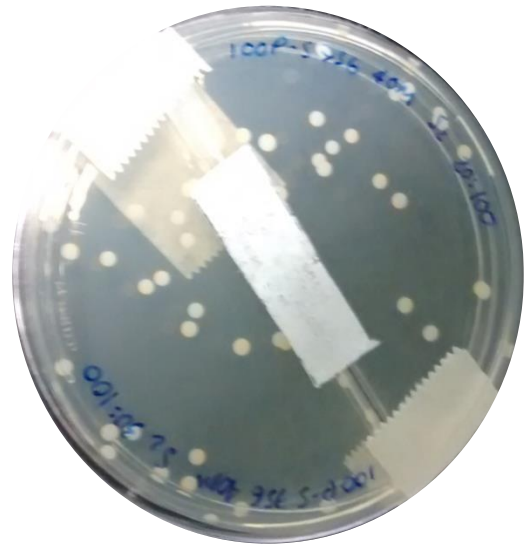
Rt: Rockefeller

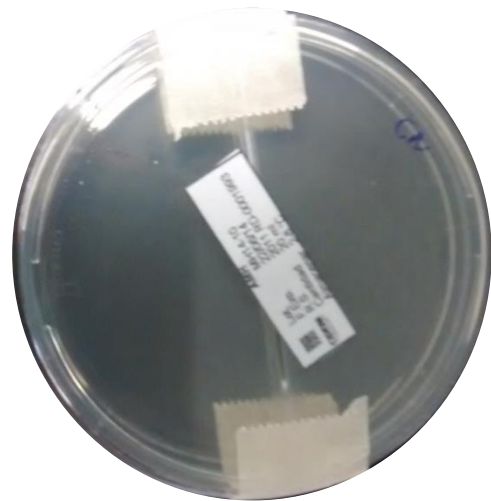
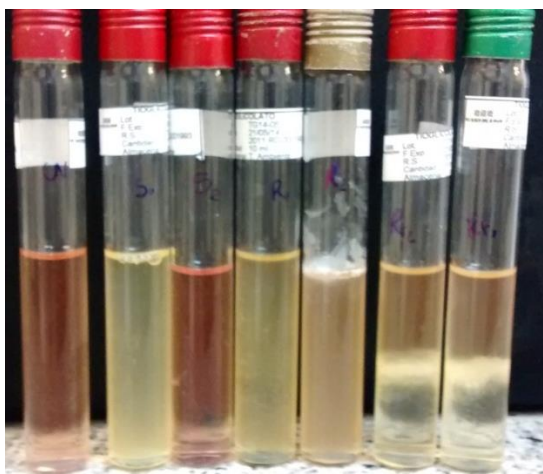
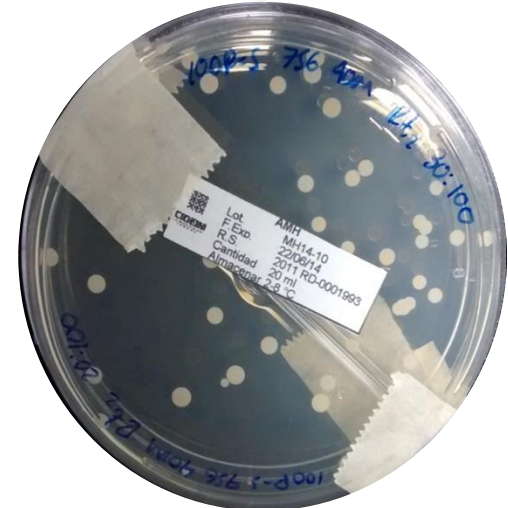
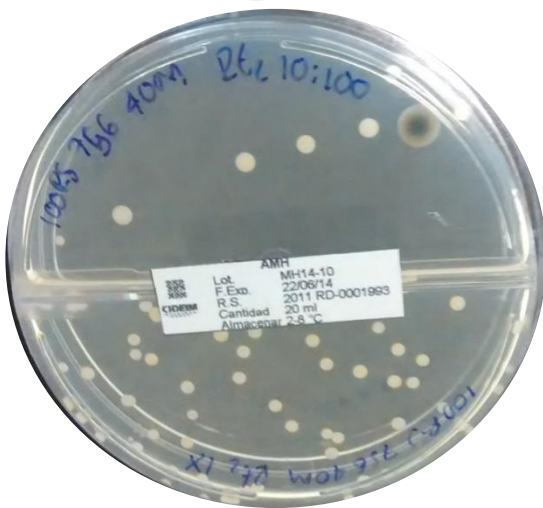
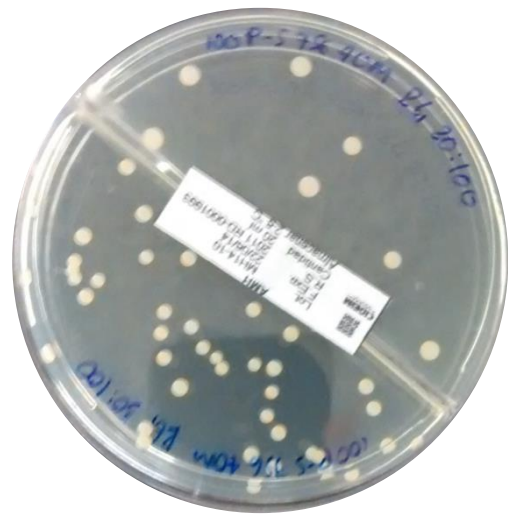
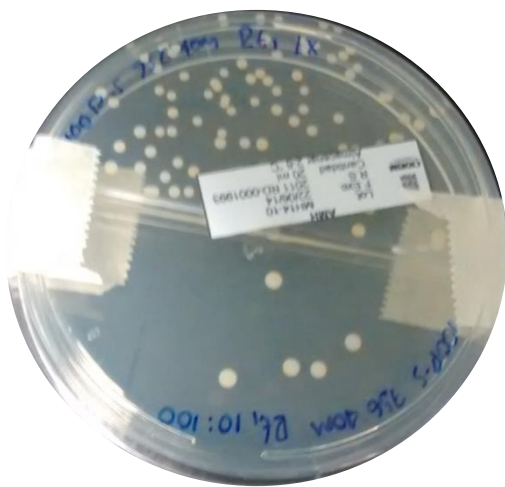
Tratamiento con metronidazol por 4 días



Tratamiento con metronidazol por 5 días

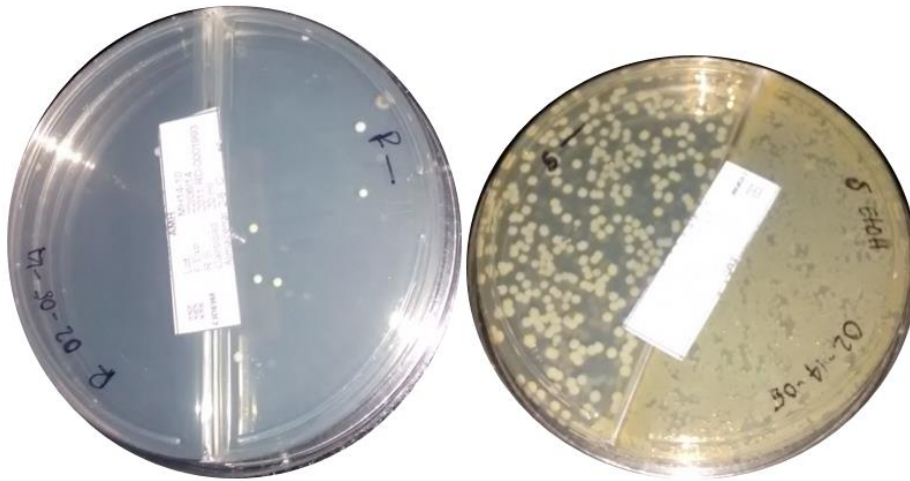




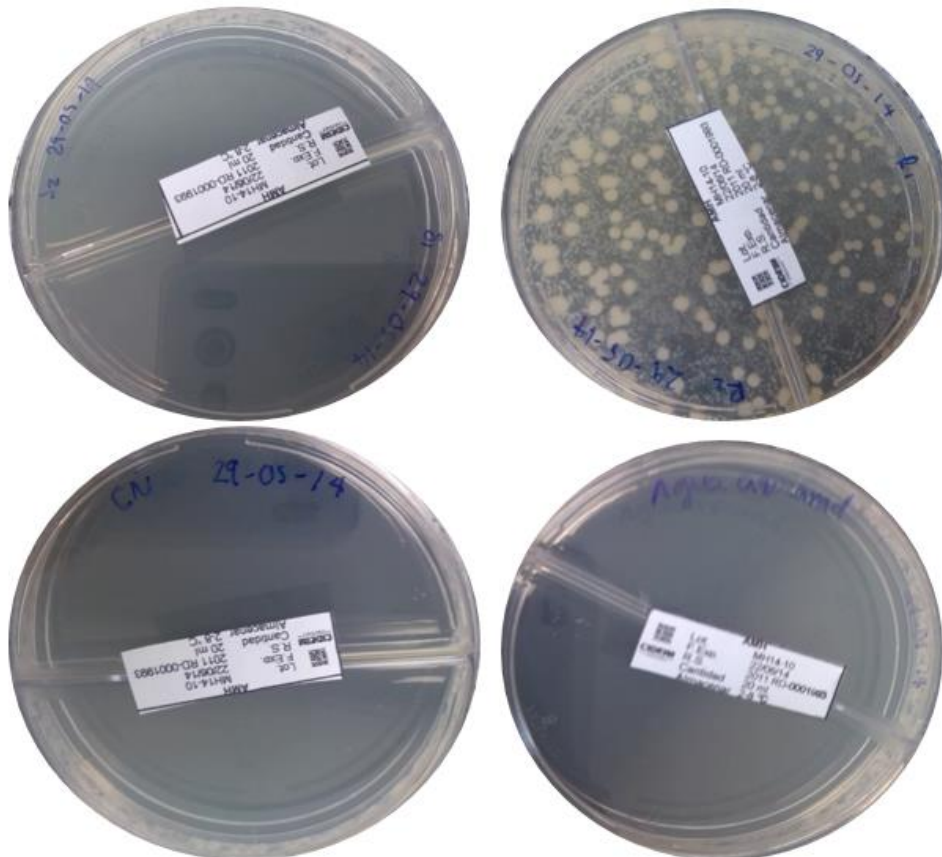


Anexo 5. Determinación del crecimiento de hongos y levaduras

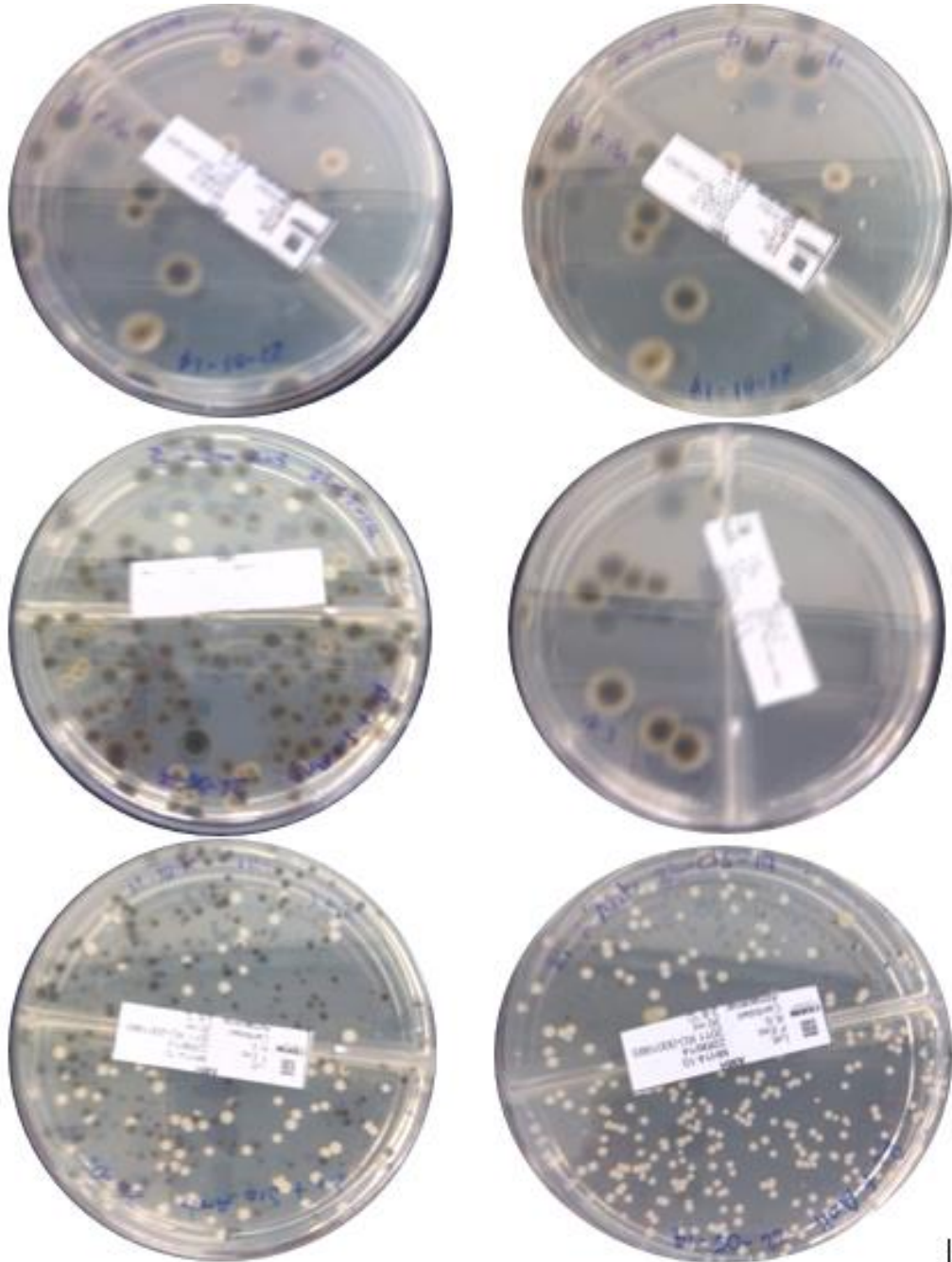
Variación en el protocolo



Azúcar



Uso del antibiótico



Anexo 6. Marcas de Reactivos

Reactivo o Equipo	Marca
higado de res importado	BD
tetramin	Tetra care
agua declorada	CIDEIM
Etanol	CIDEIM
PBS (reactivos)	Sigma/Fischer
Agar LB	BD
azúcar	Manuelita
Agua ultrapurificada	CIDEIM
Agar Mueller Hinton	BD
Tioglicolato	BD
Penicilina	Genfar
Estreptomicina	Genfar
Metronidazol	Grupo Promedca
Gentamicina	Genfar
Reactivos de la tinción de Gram	IHR diagnóstica
kit de extracción	kit DN-easy de Qiagen
dNTPs	IDT
taq	Invitrogen
L-glutamina	Gingo
Sangre de conejo desfibrinada	CIDEIM
Gel Red	Gen Script