

# Protocolo MX

## V.01.(01/2025) Albin Fontaine

---

*Unidad de Virus Emergentes (UVE: Univ. Aix-Marsella, Università di Corsica, IRD 190, Inserm 1207, IRBA), Francia.*

*Institut de Recherche Biomédicale des Armées (IRBA), Unidad de Virología, Marsella, Francia.*

---

## Antecedentes :

La detección molecular de arbovirus en las excreciones de mosquitos capturados sobre el terreno ofrece un enfoque innovador y no invasivo para vigilar su circulación en una zona. Conocido como *xenomonitorización molecular* (MX), este método ha demostrado su eficacia para detectar diversos arbovirus y parásitos sin necesidad de capturar o manipular huéspedes vertebrados.

Los mosquitos infectados excretan cargas virales mucho mayores en sus excretas que en su saliva, lo que mejora enormemente la sensibilidad de la detección molecular. Una sola hembra infectada puede liberar entre 3 y 5  $\log_{10}$  de copias de ARN viral al día (Fontaine et al., 2016) , lo que convierte a las excretas en una poderosa herramienta para el seguimiento del virus en tiempo real. Al explotar estos excrementos, la estrategia MX se sitúa en la interfaz entre la vigilancia entomológica y ambiental, lo que permite monitorizar la aparición y circulación de arbovirus en tiempo real, a bajo coste y conservando una buena sensibilidad (Ramírez et al., 2018) .

Para optimizar este enfoque, hemos diseñado un *adaptador MX* impreso en 3D, compatible con las trampas comerciales BG-Sentinel, BG Pro y CDC light. Este dispositivo sustituye a la red de recogida y proporciona un entorno húmedo y una fuente de alimento para los mosquitos capturados, prolongando su supervivencia y aumentando la producción de excrementos. Esta innovación ofrece una serie de ventajas:

- (i) **Intervalos de recogida más largos**, lo que reduce la frecuencia de las intervenciones sobre el terreno.
- (ii) **Mayores posibilidades de detección vírica**, gracias a la acumulación de excrementos durante varios días.
- (iii) **Reducción de los costes de vigilancia**, ya que la detección sigue siendo independiente del número de especímenes atrapados.

Las muestras de excrementos, recogidas en papel de aluminio, pueden transportarse a temperatura ambiente para su análisis molecular, seguido de una rápida secuenciación

genómica de los virus detectados. A diferencia de los métodos convencionales, la estrategia MX permite :

- **Control rentable**, con la posibilidad de analizar cientos de muestras al coste de unas pocas docenas.
- **Detección eficaz**, abarcando toda una comunidad de insectos vectores.
- **Logística simplificada**, con recogida y transporte sencillos sin necesidad de equipos especializados.
- **Compatibilidad con análisis complementarios**, como la identificación de especies de vectores, la estimación de la prevalencia de la infección y el aislamiento viral.

Gracias a estas modificaciones de la trampa, MX permite una monitorización vírica continua con intervalos de recogida ampliados, lo que mejora la eficacia de la vigilancia al tiempo que reduce los costes operativos. Este enfoque rápido, escalable y adaptado al terreno mejora la detección precoz de las amenazas víricas emergentes (Bigéard et al., 2024; L'Ambert et al., 2023) .

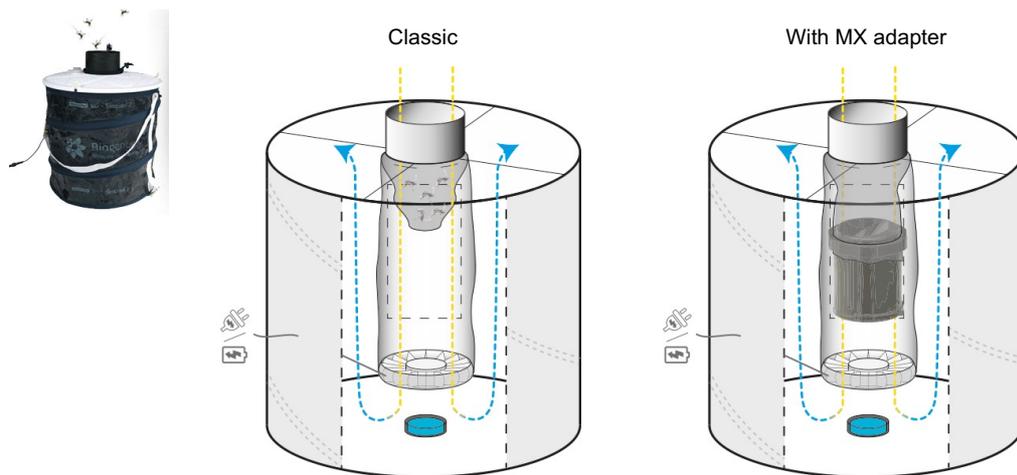


Fig1. Vista e ilustración de la trampa BG-Sentinel (Biogents) en su configuración clásica y optimizada para la recogida de excrementos con el adaptador MX.

## 1. Preparación e instalación de la trampa antimosquitos :

### 1.1 Equipo necesario sobre el terreno :

- BG Pro / BG Sentinel o Trampa de luz CDC.
- Adaptadores impresos en 3D (MosquitoBox) para recoger mosquitos y excrementos.
- Azúcar diluido al 10% (10 g en 100 mL de agua) para impregnar el algodón que se colocará en el alimentador dentro del adaptador.
- Refugio para proteger la trampa de las inclemencias meteorológicas (viento y lluvia).
- Papel de aluminio precortado para recoger los excrementos.

- (Opcional) Botellas de dióxido de carbono a presión.
- (Opcional) Baterías de 12 V para la alimentación en ausencia de tomas de corriente.

*Nota para el usuario: Es aconsejable preparar previamente el adaptador impreso en 3D colocando un círculo de papel de aluminio en el fondo y algodón empapado en agua azucarada en el alimentador. A continuación, el adaptador puede almacenarse a 4 °C durante varios días antes de su uso. Así se ahorra tiempo en el campo y se evita poner agua azucarada en el suelo, que puede atraer a las hormigas.*

## 1.1 Preparación del adaptador MX :

### 1.1.1 Presentación del dispositivo impreso en 3D

El adaptador es un cilindro cerrado por los dos extremos con un tubo hueco que lo atraviesa verticalmente. Se compone de 4 partes:

- Un tubo roscado (el cuerpo del adaptador)
- Una base (parte por la que pasa el tubo más pequeño y que está cerrada por una rejilla)
- Una parte superior (la parte por la que pasa el tubo más largo)
- Un pesebre
- Una red (para sujetarla en la boca de la trampa)

Todas las piezas están disponibles [aquí](#) con instrucciones de impresión.



Fig2. Vistas del adaptador MX con su rosca.

### 1.1.2 Creación de la red

- a. Prepare una plantilla con un círculo de 16,5 cm, con un agujero de 4 cm en el centro. Mantén el ángulo a 165 grados y añade una tira de 1,5 cm en un lado para coser.



- b. Utiliza la plantilla para trazar el contorno de las piezas en la tela (mosquitera o tela que deje pasar el aire pero no los insectos).
- c. Corta tramos de cuerda trenzada de poliéster (unos 50 cm) y quema sus extremos con un mechero.
- d. Utilice unos alicates para formar un canalón con el cordón en su interior
- e. Coser el canalón, quitando los clips, y coser el borde recto para formar un cono.
- f. La red se puede montar en el adaptador (desenroscar la tapa del extremo superior, colocarla en la base de la red (agujero pequeño) y volver a enroscar el conjunto).

### 1.1.3 Preparación de alimentos (10% de agua azucarada)

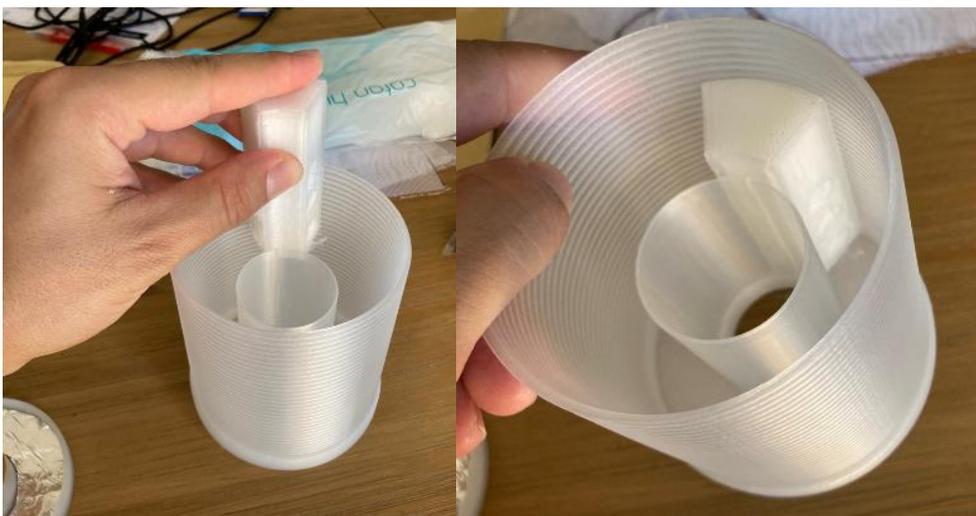
- Comienza desenroscando la base para acceder al interior y retira el alimentador tirando de él hacia abajo.



- Rellene el comedero con algodón empapado en agua azucarada al 10% (10 g por 100 ml). Esta operación puede realizarse el día anterior, en cuyo caso los comederos deben conservarse a 4°C.



- Vuelva a deslizar el alimentador en el adaptador, abriéndolo hacia arriba, a lo largo de la pared.



#### 1.1.4 Preparación de soportes para excrementos de papel de aluminio

- Recorta el papel de aluminio con la plantilla de corte (donuts). Puedes recortar varios a la vez.
- 



*Vamos a crear unos cortapastas para facilitar esta tarea.*

- Coloque una hoja, con la cara mate hacia arriba, en la parte inferior del adaptador. Vuelva a enroscar la base en el cilindro para cerrar el adaptador.



## 1.2 Instalación de la trampa adaptada MX :

- Coloque la trampa al abrigo del viento y la lluvia (bajo un tejado, debajo de una mesa, etc.). *MX odia la lluvia; arrastra el material genético depositado en el papel de aluminio.*

- Monte el sifón BG Pro siguiendo las instrucciones suministradas.
- Instale el adaptador MX dentro de la trampa



El adaptador puede fijarse a la boca de la trampa utilizando la red como se muestra en la foto. Alternativamente, puedes colocar primero el adaptador dentro de la trampa, abrir la red y dejar que se extienda alrededor de la entrada de la trampa, luego fijar la boca de la trampa sobre ella. En resumen, mientras los mosquitos pasen y el ventilador esté en marcha, todo va bien. 😊

- Instale un atrayente BG (Biogents) o (opcional) una botella de dióxido de carbono para atraer a los mosquitos.
- Compruebe que la trampa funciona correctamente y dispone de alimentación eléctrica (batería o red). *Compruebe que la trampilla se abre.*

## 2. Recogida de excrementos y mosquitos :

### 2.1 Procedimiento de recogida :

- Capture mosquitos adultos durante un periodo de 3 a 7 días consecutivos.
- Al recoger, retire con cuidado el adaptador MX de la trampa BG Pro mientras el ventilador sigue en marcha, para evitar que se escape.
- Lleve los mosquitos vivos en el adaptador doblando la red dentro del tubo del adaptador para evitar que se escapen.
- Los mosquitos pueden conservarse así a temperatura ambiente durante varios días.
- Una vez en el laboratorio, coloque los adaptadores a -20 °C durante al menos 30 minutos para matar a los insectos capturados.
- Transferir los mosquitos neutralizados a un tubo de 50 mL. Colocar a -20°C.
- Retira el papel de aluminio cubierto de excrementos y colócalo en una bolsa de plástico cerrada (o entre dos hojas de papel, que es más ecológico).



*En algunos casos, puede ser necesario retirar los excrementos de insectos o caracoles, hojas muertas, etc. con unas pinzas para aflojar el papel de aluminio. Estas fotos muestran el aspecto de los excrementos de mosquito.*

- Identifique claramente cada muestra con la fecha y el lugar de recogida. *Es importante poder volver sobre las recogidas una vez detectado el virus en los excrementos.*

## 3. Transporte de muestras :

- Envíe el papel de aluminio que contiene los excrementos por correo al laboratorio de análisis, a temperatura ambiente. El ARN vírico puede conservarse varios días a temperatura ambiente, incluso en verano.

## 4. Procesamiento de muestras en el laboratorio :

### 4.1 Recepción y registro :

- Una vez recibidas las muestras, registre cada una de ellas en una base de datos con los detalles de la recogida (fecha, lugar, etc.).

## 4.2 Preparación del papel de aluminio recubierto de excrementos :

- Utilizar guantes y equipo de protección individual al manipular las muestras.
- Enrolle la lámina en un cigarrillo grueso. Hacer una bolita gruesa funciona igual de bien. Colocar en un tubo de 14mL con tapón.

## 4.3 Extracción de ARN vírico de excrementos :

- Añada 800 uL de tampón de lisis RAV1 (NucleoSpin 96 virus core kit, Macherey-Nagel) y 10 µL de fago MS2 (control interno de extracción) a cada tubo

*En esta fase puede utilizarse otro tampón de lisis o PBS*

- Agitar enérgicamente durante 1 minuto para disolver los excrementos en el tampón líquido.
- Añada 800 uL de etanol al 96-100% y, a continuación, cargue en las columnas NucleoSpin Virus en varios pasos para extraer el ARN/ADN según las instrucciones del fabricante.
- *[OPCIONAL] Es posible eluir en un volumen mayor, cambiar el tampón de lisis o el kit de extracción o eluir en PBS. Todo funciona y ya ha sido probado. Adáptelo a su protocolo local. El objetivo es eluir los excrementos sólidos en líquido para su extracción. Las dosis de ARN viral son elevadas, así que recuerde que el volumen en el que se extraiga la muestra no tendrá un impacto importante en la sensibilidad de detección.*
- Mantener los eluas a 4°C hasta la detección o a -20°C para su almacenamiento a largo plazo.

## 5. Detección del virus mediante RT-PCR :

### 5.1 Preparación de la RT-PCR :

Utilizamos diversos métodos de extracción y detección. Todos nuestros métodos de detección molecular utilizan Q-RT-PCR con un sistema de cebadores y sondas de EVAg , el Archivo Europeo de Virus. Aquí encontrará todos nuestros sistemas de detección y una amplia selección de controles internos y protocolos.

Desde 2008, el Archivo Europeo de Virus (EVA) es una infraestructura dedicada a la caracterización, producción y distribución de recursos virales de referencia para apoyar la investigación virológica en Europa. Reúne a laboratorios de la UE y de fuera de la UE que trabajan en virología humana, animal y vegetal, de acuerdo con el concepto "Una

Virología". De forma similar al concepto "Una sola salud", que vincula la salud humana, animal y medioambiental, "Una sola virología" hace hincapié en el papel central de los virus en estos sistemas, lo que convierte a la virología en una disciplina clave.

El EVA proporciona acceso constante a cepas víricas, herramientas de diagnóstico y material de investigación. Esta disponibilidad mejora la preparación ante epidemias, estimula la innovación en vacunas, antivirales y diagnósticos, y facilita la transferencia de conocimientos. Su acción apoya la salud pública y la seguridad mundial, y refuerza la soberanía de la UE frente a las amenazas pandémicas.



[Lista del portal EVAg EVAg |](#)

## Referencias

- Bigéard, C., Pezzi, L., Klitting, R., Ayhan, N., L'Ambert, G., Gomez, N., Piorkowski, G., Amaral, R., Durand, G. A., Ramiara, K., Migné, C., Grard, G., Touzet, T., Zientara, S., Charrel, R., Gonzalez, G., Duvignaud, A., Malvy, D., De Lamballerie, X., & Fontaine, A. (2024). *Molecular Xenomonitoring (MX) allows real-time surveillance of West Nile and Usutu virus in mosquito populations*. <https://doi.org/10.1101/2024.04.10.588707>
- Fontaine, A., Jiolle, D., Moltini-Conclois, I., Lequime, S., & Lambrechts, L. (2016). La excreción de ARN del virus del dengue por *Aedes aegypti* permite la monitorización no destructiva de la diseminación viral en mosquitos individuales. *Scientific Reports*, 6, 24885. <https://doi.org/10.1038/srep24885>
- L'Ambert, G., Gendrot, M., Briolant, S., Nguyen, A., Pages, S., Bosio, L., Palomo, V., Gomez, N., Benoit, N., Savini, H., Pradines, B., Durand, G. A., Leparç-Goffart, I., Grard, G., & Fontaine, A. (2023). Analysis of trapped mosquito excreta as a noninvasive method to reveal biodiversity and arbovirus circulation. *Molecular Ecology Resources*, 23 (2), 410-423. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.13716>
- Ramírez, A. L., Hall-Mendelin, S., Doggett, S. L., Hewitson, G. R., McMahon, J. L., Ritchie, S. A., & van den Hurk, A. F. (2018). Excrementos de mosquitos: un tipo de muestra con muchas aplicaciones potenciales para la investigación de la ecología del virus del río

Ross y del virus del Nilo Occidental. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 12 (8), e0006771. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006771>