



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL NORDESTE

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales y Agrimensura

Tesis para la obtención del grado académico de doctor en
Ciencias Biológicas

2019

“Interacciones competitivas entre poblaciones naturales de
Aedes aegypti y *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) de
Misiones: una perspectiva desde la patogenicidad diferencial
de los parásitos naturales”

Lic. Ana Carolina Alonso

Área de Entomología

Instituto de Medicina Regional-UNNE

Director: María Victoria Micieli

Co-director: Marina Stein

RECONOCIMIENTO

MI RECONOCIMIENTO AL CONSEJO NACIONAL DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS Y TÉCNICAS (CONICET), AGENCIA NACIONAL DE PROMOCION CIENTIFICA Y AL INSTITUTO DE MEDICINA REGIONAL (UNNE), POR HABER HECHO POSIBLE LA REALIZACIÓN DE ESTE TRABAJO DE TESIS DOCTORAL.

DEDICATORIAS

A mis padres Florinda y Segundo

“No hay fácil ni difícil; fácil es lo que ya sabemos hacer; difícil, lo que aún no hemos aprendido a hacer bien”

Bernardo Houssay

AGRADECIMIENTOS

A mis directoras, la Dra. Marina Stein por darme la oportunidad de formar parte de su grupo de trabajo y dedicar su tiempo a mi formación, acompañándome en el difícil, pero hermoso y apasionante camino de la ciencia, a la Dra. María Victoria Micieli por su tiempo y dedicación. Ambas mujeres apasionadas por la ciencia y fuente de inspiración.

Al señor Carlos Paredes Jefe del departamento de Saneamiento Ambiental y principalmente a los Técnicos en Control de Vectores de la Municipalidad de Eldorado, por su valioso aporte y sin los cuales hubiese sido imposible realizar el presente trabajo.

A Juanita, Técnica del laboratorio de Entomología del Instituto de medicina Regional por ayudarme en la identificación de los especímenes.

A mis compañeros del laboratorio Debo, Grise, Orne, Javi y Jani, por los lindos momentos compartidos, por las risas y llantos.

A mi amiga y compañera de escritorio, Carla por brindarme su ayuda y amistad desde el primer día que llegue al laboratorio.

A mis amigas de la vida Romi, Celia y Agos que desde la distancia siempre me apoyaron.

A mi familia, principalmente mi hermano Sergio que hizo posible mi estadía en Chaco los primeros meses.

A mi compañero de ruta en esta etapa Pablo, por todo.

A todas las personas que fueron parte de este sueño.

ÍNDICE

Resumen	1
Introducción general	6
Características generales de los mosquitos.....	7
Familia Culicidae.....	7
Ciclo de vida.....	9
Taxonomía y morfología de <i>Aedes</i> spp.....	14
Importancia sanitaria.....	16
Enfermedades parasitarias.....	17
Enfermedades por arbovirosis.....	18
Microorganismos asociados a insectos.....	20
Rutas de ingreso al insecto.....	22
Microorganismos hallados en Culícidos.....	22
Estudios en Argentina.....	24
Bibliografía.....	26
Objetivo general y específicos	31
Sección I Ecología de <i>Aedes aegypti</i> y <i>Aedes albopictus</i> (Diptera: Culicidae) de la localidad de Eldorado, Misiones	
Introducción.....	33
Biología y distribución geográfica de <i>Aedes aegypti</i> (L.) y <i>Ae. albopictus</i> (Skuse) (Diptera: Culicidae).....	33
<i>Aedes</i> (Stegomyia) <i>aegypti</i> (Linnaeus).....	34
Distribución en Argentina.....	35
<i>Aedes</i> (Stegomyia) <i>albopictus</i> (Skuse).....	36
Distribución en Argentina.....	37
Poblaciones simpátricas: Interacciones entre <i>Aedes aegypti</i> (L.) y <i>Ae. albopictus</i> (Skuse) (Diptera: Culicidae).....	38
Segregación por hábitat.....	38
Competencia por los recursos.....	39
Interferencia química.....	39
Competencia de apareamiento o satirización.....	40
Eclosión retardada.....	40
Competencia a través de la infección diferencial por <i>Ascogregarina</i>	41
.....	41
Mecanismos de coexistencia en Argentina.....	41

Bibliografía.....	42
Capítulo 1: Distribución espacio temporal de <i>Aedes aegypti</i> y <i>Aedes albopictus</i> en Eldorado, Misiones.....	49
Introducción.....	50
Influencia del ambiente y las variables climáticas en la biología de <i>Aedes</i> spp.....	50
Distribución temporal de <i>Aedes aegypti</i> y <i>Ae. albopictus</i> en Argentina...	53
Distribución espacial de <i>Aedes aegypti</i> y <i>Ae. albopictus</i> en Argentina.....	53
Materiales y métodos.....	55
Descripción del área de estudio.....	55
Recolección de culícidos.....	56
Viviendas familiares.....	57
Cementerios.....	58
Gomerías.....	59
Parque Schwelm.....	60
Identificación de individuos.....	63
Análisis de datos.....	63
Resultados.....	65
Distribución espacial de <i>Aedes aegypti</i> y <i>Ae. albopictus</i> en la ciudad de Eldorado, Misiones.....	65
Distribución temporal de <i>Aedes aegypti</i> y <i>Ae. albopictus</i> en la ciudad de Eldorado, Misiones.....	67
Relación entre las abundancias mensuales y las variables ambientales	69
Discusión.....	73
Bibliografía.....	80
Capítulo 2 Hábitats larvales de <i>Aedes aegypti</i> (Linnaeus) y <i>Aedes albopictus</i> (Skuse) en la localidad de Eldorado, Misiones.....	88
Introducción.....	89
Materiales y métodos.....	92
Análisis de datos.....	92
Resultados.....	94
Análisis considerando cada tipo de hábitat en función de las categorías AA, AE y AAE.....	98

Análisis considerando todos los tipos de hábitats en función de las categorías AA, AE y AAE.....	99
Discusión	101
Bibliografía.....	106
Sección II Patógenos de mosquitos (Diptera: Culicidae) de importancia sanitaria	
Introducción.....	113
Microorganismos patógenos encontrados en larvas de <i>Aedes aegypti</i> (Linnaeus) y <i>Ae. albopictus</i> (Skuse) (Diptera: Culicidae).....	114
Hongos.....	114
Microsporidios.....	115
Gregarinas.....	116
Virus.....	116
Bacterias.....	117
Capítulo 1: Prospección de patógenos en poblaciones naturales de <i>Aedes aegypti</i> y <i>Ae. albopictus</i>	
Introducción.....	124
Materiales y métodos.....	125
Metodología de muestreo.....	125
Observación macroscópica.....	125
Observación microscópica.....	126
Disección de aparato digestivo.....	126
Detección molecular.....	126
Resultados.....	127
Capítulo 2 <i>Wolbachia</i> en poblaciones naturales de <i>Aedes albopictus</i> en la localidad de Eldorado, Misiones	
Introducción.....	129
Taxonomía y filogenia.....	129
Métodos de detección e identificación de cepas de <i>Wolbachia</i>	130
Efectos de la infección por <i>Wolbachia</i>	131
Alteraciones reproductivas.....	131
Alteraciones no reproductivas.....	132
Infección por <i>Wolbachia</i> en mosquitos.....	132
Aplicaciones de <i>Wolbachia</i> en el control biológico.....	134

Estudios previos en poblaciones naturales de mosquitos en Argentina	135
Materiales y métodos.....	136
Extracción de ADN.....	136
Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).....	136
Análisis de datos.....	137
Resultados.....	139
Detección y prevalencia de cepas de <i>Wolbachia</i> presentes en larvas de <i>Aedes albopictus</i> de la localidad de Eldorado, Misiones.....	139
Modelos de Probabilidad Lineal (MPL).....	141
Discusión.....	143
Bibliografía.....	147

Capítulo 3 Ascogregarinas (Eugregarinorida: Ascogregarinidae) en poblaciones naturales de *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) de Eldorado, Misiones.....

Introducción.....	153
<i>Ascogregarina</i>	154
Ciclo de vida.....	155
<i>Ascogregarina culicis</i> y <i>Ascogregarina taiwanensis</i>	156
Impacto de las gregarinas sobre el fitness de los mosquitos y especificidad de huésped.....	157
Materiales y métodos.....	161
Área de estudio.....	161
Metodología de muestreo.....	161
Detección y caracterización morfológica de <i>Ascogregarina</i> spp.....	162
Prevalencia e intensidad de infección.....	162
Análisis de datos.....	163
Identificación molecular de <i>Ascogregarina</i> spp.....	163
Extracción de ADN.....	163
Amplificación por PCR.....	164
Análisis de secuencias y relación filogenética.....	165
Resultados.....	166
Detección y caracterización morfológica de <i>Ascogregarina</i> spp.....	166

Prevalencia e intensidad de infección de <i>Aedes</i> spp. con ascogregarinas	
<i>Ascogregarina culicis</i>	167
<i>Ascogregarina taiwanensis</i>	173
Identificación molecular de <i>Ascogregarina</i>	178
Extracción de ADN y amplificación por PCR.....	178
Análisis de secuencias y relación filogenética.....	179
Discusión.....	181
Bibliografía.....	187
Capítulo 4 Consideraciones y perspectivas sobre la relación parásito- hospedador	192
<i>Wolbachia</i> en <i>Aedes albopictus</i> de Misiones.....	193
<i>Ascogregarina culicis</i> y <i>A. taiwanensis</i>	196
Conclusión general y Perspectivas futuras	199

“Interacciones competitivas entre poblaciones naturales de *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) de Misiones: una perspectiva desde la patogenicidad diferencial de los parásitos naturales”

RESUMEN

Los objetivos planteados en el presente estudio realizado en la localidad de Eldorado, Provincia de Misiones fueron, 1) conocer la distribución estacional de *Aedes aegypti* y *Ae. albopictus* en la localidad de Eldorado, Misiones; 2) determinar las características físicas de los criaderos, y los criaderos predominantes; 3) identificar los organismos parásitos hallados en especies de mosquitos invasivas: *Aedes aegypti* y *Ae. albopictus*; 4) determinar la prevalencia de infección y la estacionalidad de los patógenos hallados sobre las poblaciones naturales de ambas especies vectores; 5) determinar las relaciones entre los parásitos hallados, las abundancias de *Ae. aegypti* y *Ae. albopictus* y las características de los criaderos donde se los encuentra.

Para analizar la distribución espacial y temporal de poblaciones simpátricas de *Ae. aegypti* y *Ae. albopictus*, determinar su asociación con las variables ambientales e identificar los hábitats más productivos para ambas especies; se realizaron capturas mensuales de larvas y/o pupas desde mayo de 2016 a abril de 2018 de hábitats artificiales y hábitats naturales en 4 tipos de sitios o paisajes (viviendas familiares, gomerías, cementerio y parque). Además los hábitats larvales fueron clasificados en otras tres categorías: presencia de *Aedes aegypti* (AE) sin presencia de *Ae. albopictus*, presencia de *Ae. albopictus* sin *Ae. aegypti* (AA) y presencia de ambas especies (AAE).

Se recolectaron 20.057 larvas de *Ae. aegypti*, 3150 de *Ae. albopictus* y 4570 de otros culícidos (*Aedes* spp., *Culex* spp., *Limatus* spp., *Sabethes* spp., *Toxorhynchites* spp., *Wyeomyia* spp.). *Aedes aegypti* y *Ae. albopictus* se registraron durante los 24 meses de muestreo, con un amplio predominio en relación a sus abundancias de la especie *Ae. aegypti* sobre *Ae. albopictus*; con valores máximos de *Ae. albopictus* con respecto a *Ae. aegypti*, de 5/10.

La mayor abundancia de *Ae. aegypti* se encontró en las viviendas familiares y la menor abundancia en parque. Para *Ae. albopictus*, las gomerías presentaron la menor abundancia de larvas y en el resto de los sitios no hubo

diferencias estadísticamente significativas entre sí. El cementerio presentó la mayor abundancia de recipientes de cría AE y AAE. Mientras que la menor cantidad de recipientes AE se encontró en el parque. *Aedes albopictus* sin compartir hábitat con *Ae. aegypti* (AA) se encontró mayoritariamente en parque, el resto de los sitios presentaron similares proporciones. Estos resultados podrían sugerir a la segregación de hábitats como un factor de la co-existencia de ambas especies en la ciudad de Eldorado. La mayor abundancia de *Ae. aegypti* se encontró en los meses diciembre, febrero, mayo y abril; de *Ae. albopictus* febrero, marzo y abril. Las variables ambientales con correlación positiva para ambas especies fueron la precipitación; la temperatura mínima, máxima y media.

Con respecto a las características de los criaderos dónde se hallaron larvas y/o pupas de ambas especies de *Aedes*, en general estuvieron ubicados bajo sombra parcial o pleno sol y la temperatura del agua osciló entre 5,4 y 37,1°C. Algunos presentaban materia orgánica e incluso olor desagradable. El agua de los criaderos fue mayoritariamente clara, de color marrón, con pH que osciló entre 3,17 y 12,11. La abundancia de *Ae. aegypti* y *Ae. albopictus* se correlacionó de manera significativa y positiva con la temperatura del agua, *Ae. albopictus* además presentó una correlación negativa con el pH. *Aedes albopictus* sin *Ae. aegypti* se encontró mayoritariamente en recipientes naturales (tocón de tacuara, bromelia y huecos de árboles), con pH ácido (media de 5,45), con temperaturas del agua que variaron entre 18,8°C y 28,2°C (media de 23,33°C), ubicados a la sombra parcial. *Aedes aegypti* habitando sin *Ae. albopictus*, se encontró en mayor número en neumáticos (categoría caucho), recipientes plásticos y recipientes de vidrio, que presentaron pH básico con medias de 8,35, 8,08 y 8,63 respectivamente. Las temperaturas medias del agua de estos hábitats fueron de 22,97°C, 24,19°C y 25,1°C respectivamente. El mayor número de hábitats compartido (AAE) se encontró en las categorías recipientes plásticos, recipientes de vidrio y de caucho.

Los resultados expuestos permiten suponer que ambas especies responden de manera diferente a las características ambientales y de hábitat, lo que requiere de mayores estudios experimentales y a campo que permitan dilucidar los mecanismos que están actualmente permitiendo su co-existencia.

Para realizar la búsqueda de patógenos y determinar la prevalencia de infección y la estacionalidad en poblaciones naturales de *Ae. aegypti* y *Ae. albopictus*, como primer paso se tomaron pequeños grupos de larvas de cada muestra recolectada a campo y se realizaron observaciones bajo la luz de un microscopio estereoscópico buscando detectar alguna sintomatología característica de microorganismos patógenos. Por otro lado se realizaron disecciones del tracto digestivo para la búsqueda de patógenos/simbiontes bajo la luz de un microscopio estereoscópico y posteriormente se observó bajo microscopio de luz convencional. Además se realizó la extracción de ADN para la identificación molecular por PCR con cebadores específicos posterior a la detección de los mismos.

Durante los dos años de muestreo no fue detectada ninguna sintomatología correspondiente a infecciones por patógenos fúngicos o virales, en los estados inmaduros de ambas especies de culícidos. Las disecciones del tubo digestivo permitieron identificar gregarinas en ambas especies de mosquitos. La búsqueda de patógenos/simbiontes bacterianos se enfocó en *Wolbachia* no habiéndose detectado otra infección bacteriana durante la observación al microscopio óptico.

Se identificaron dos especies de *Ascogregarina*; *A. culicis* en *Ae. aegypti* y *A. taiwanensis* en *Ae. albopictus*. También fueron identificadas dos cepas de *Wolbachia*, *wAlbA* y *wAlbB* en ejemplares de *Ae. albopictus*, en forma de simple infección y superinfección. Esta bacteria no fue detectada en ejemplares de *Ae. aegypti* que compartían el hábitat con *Ae. albopictus*.

Los trofozoítos de *Ascogregarina* spp. fueron identificados siguiendo la descripción de Reyes-Villanueva *et al.* (2001). Se tomaron fotografías y se realizaron las mediciones de largo y ancho de 49 trofozoítos de *A. culicis* y 75 de *A. taiwanensis*. Se diseccionaron 1333 larvas de *Ae. aegypti* con una prevalencia de infección para *A. culicis* de 34,81% (N=464). Los trofozoítos se observaron en el lumen del intestino medio y en el exterior del mismo, en larvas de III y IV estadio. El tamaño fue bastante variable, presentando una media de 82,22 μm ($\pm 21,69$) de largo y 28,27 μm ($\pm 9,61$) de ancho. Con respecto a la forma de los mismos la parte anterior que comprende el protomerito y epimerito es perceptiblemente más ancha que la parte cónica correspondiente al deutomerito, siendo similar a una coma. La intensidad de infección varió entre 1 y 250

trofozoítos por individuo. La amplificación de un fragmento del gen ribosomal 18S permitió por comparación con la base de datos genética, demostrar la identidad de la especie con otras secuencias de *A. culicis*.

En cuanto a *Ae.albopictus* se diseccionaron 188 larvas, con una prevalencia de infección de 37,23 %. Los trofozoítos de *A. taiwanensis* encontrados en el lumen del intestino medio de larvas de *Ae.albopictus* presentaron un deutomerito mucho más corto y que termina en forma más abrupta que *A. culicis*. Con respecto al tamaño presentaron una longitud de 81,60 μm ($\pm 20,4$) y un ancho de 40,04 μm ($\pm 13,24$), N=75. La intensidad de infección varió de 1 a 327 trofozoítos por larva. En relación con su identificación molecular, la secuenciación del fragmento obtenido fue de baja calidad no permitiendo su identificación. A partir de los resultados obtenidos en este trabajo sobre prevalencia e intensidad de estas gregarinas sobre sus hospedadores se plantea continuar con estudios experimentales de sus efectos sobre el fitness de *Ae. albopictus* principalmente, en donde fue observada una intensidad media alta de la gregarina y una baja abundancia del mosquito.

Para la detección de *Wolbachia*, el ADN genómico fue extraído de larvas de *Ae.albopictus* y de algunos ejemplares de *Ae. aegypti*. Durante el primer año de muestreo se armaron pools de individuos y durante el segundo año las larvas se procesaron de manera individual para obtener datos de prevalencia. La detección de la bacteria se realizó mediante PCR, utilizando los cebadores que amplifican la proteína superficial *wsp*. Se realizaron 502 extracciones de ADN distribuidas de la siguiente manera, desde el mes de mayo de 2016 a abril de 2017, 81 pools; de mayo de 2017 a abril de 2018, 407 extracciones individuales. La prevalencia de infección fue del 76,65 %, donde el 4,07 % únicamente estaba infectado con *wAlbA*; el 23,83 % sólo con *wAlbB* y 52,58 % representaba doble infección con las cepas *wAlbA/wAlbB*. La cepa *wAlbA* fue identificada por única vez en una larva de *Ae. albopictus* recolectada en un neumático de una gomera. *Wolbachia* puede verse afectada por diferentes factores, como la temperatura y pH del hábitat. En nuestro estudio encontramos que el aumento de la temperatura en el microambiente incrementa la probabilidad de infección con cepa *wAlbB*, este dato resulta de gran interés porque esta cepa tendría la potencialidad de utilizarse para transinfección de *Ae. aegypti* en esta región sub tropical. La cepa de *Wolbachia wAlbB* al ser menos susceptible a los efectos de

las altas temperaturas que la cepa *wMel* usada para infectar y controlar poblaciones de *Ae. aegypti*, sugiere que esta cepa podría ser la adecuada para el reemplazo poblacional en ambientes cálidos. Además en el presente trabajo las detecciones negativas para *Ae. aegypti* de poblaciones simpátricas con *Ae. albopictus* demuestran que al menos en las cepas *wAlbA* y *wAlbB* no habría transferencia horizontal. Nuestros resultados permitirían especular con la penetración de la incompatibilidad citoplasmática en la población, lo cual podría explicar en parte la baja abundancia de *Ae. albopictus* dado los efectos sobre la fertilidad que este fenómeno genera en las poblaciones. Siguiendo con esta hipótesis se propone como pasos siguientes la comparación de los parámetros adaptativos como fecundidad, fertilidad, supervivencia, proporción de sexos e incompatibilidad citoplasmática entre colonias experimentales de *Ae. albopictus* provenientes de Eldorado, infectadas y libres de *Wolbachia*.

INTRODUCCION GENERAL

INTRODUCCIÓN GENERAL

Características generales de los mosquitos

Los mosquitos pertenecen a la Clase Insecta, y al igual que otros grupos de animales como los crustáceos, quilópodos y arácnidos están incluidos en el Phylum Arthropoda caracterizados por presentar apéndices del cuerpo (patas y antenas) articulados. Poseen además un exoesqueleto secretado por la epidermis subyacente el cual es reemplazado a medida que el organismo crece, este proceso se denomina muda y el exoesqueleto viejo, exuvia. La Clase Insecta presenta el mayor número de especies dentro de los artrópodos, ocupando todos los nichos ecológicos de la biosfera.

El cuerpo de los insectos está dividido en cabeza, donde existen un par de antenas y un par de ojos compuestos; tórax generalmente con dos pares de alas y tres pares de patas; abdomen, donde se ubican en la parte posterior el aparato reproductivo.

La Clase Insecta está dividida en 26 órdenes. El orden Diptera que contiene a los mosquitos, se caracteriza por poseer un par de alas anteriores funcionales y el par posterior reducido, denominados halterios o balancín, útil para el equilibrio (Rossi & Almirón, 2003; Forattini, 1996). Son además insectos holometábolos (su ciclo vital comprende cuatro estados: huevo, larva, pupa y adulto) y en las formas adultas el aparato bucal está adaptado para picar, succionar o lamer.

FAMILIA CULICIDAE

Los culícidos son dípteros de pequeño tamaño y cuerpo delgado, siendo los machos generalmente más pequeños que las hembras. Se distribuyen en aproximadamente 40 géneros, encontrándose en la región Neotropical el mayor nivel de endemismo (Forattini, 1996).

Poseen como característica distintiva de los otros integrantes del orden Diptera, la presencia de escamas en las venas alares. Los ocelos están ausentes. Las antenas son largas formadas por 15 a 16 segmentos, el primero es estrecho y con forma de anillo se denomina “escapo”; el segundo es globoso

“pedicelo”; el resto de los segmentos son alargados, y se denominan “segmentos flagelares”. El aspecto de esta última porción varía de acuerdo al sexo de los mosquitos, en los machos los pelos insertos en los segmentos son más numerosos y largos (antenas plumosas) que en las hembras (antenas pilosas).

Los ojos compuestos y muy desarrollados ocupan gran parte de la superficie anterolateral de la cápsula cefálica. Entre los ojos y por debajo de las antenas, se encuentra una estructura llamada cípeo, y más abajo se encuentra el conjunto de apéndices del aparato bucal de tipo suctor-picador. Esta acción de succionar- picar de manera estricta está restringida a las hembras para la hematofagia (alimentarse de sangre). En el macho el aparato bucal se considera sifonador-suctor, útil para la alimentación a partir de sustancias vegetales azucaradas (Forattini, 1996; Consoli & Lourenço-De-Oliveira, 1994) (Fig. 1).

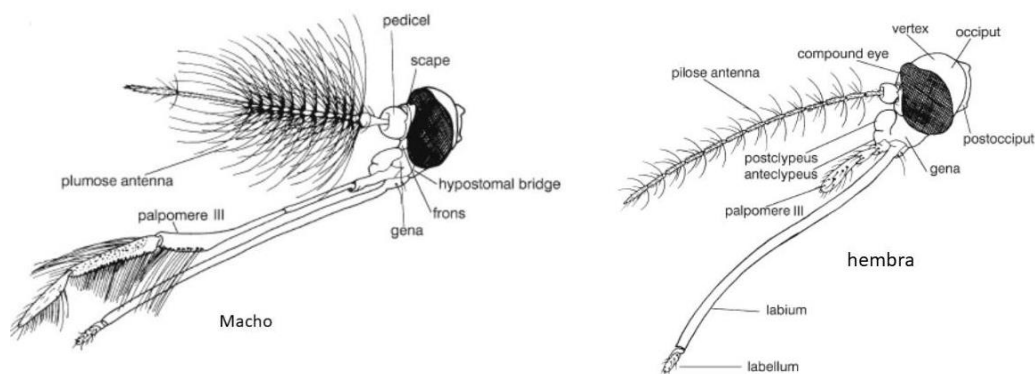


Figura 1. Diferenciación sexual de mosquitos adultos a nivel de la cabeza. Se observan los palpos maxilares más desarrollados y antenas plumosas en el macho, en la hembra antenas pilosas. Extraído de Becker *et al.*, 2010.

Como los dípteros en general, el protórax y el metatórax están poco desarrollados, ocupando el mesotórax casi la totalidad del tagma, con la inserción de las alas funcionales en esta región. Los halterios se ubican en el metatórax y estarían relacionadas con la orientación y el equilibrio en el vuelo.

En el tórax se ubican además lateralmente, los orificios denominados espiráculos, que constituyen las aberturas de las tráqueas hacia el exterior. Los espiráculos sirven de referencia para la localización de las áreas pre, hipo y post espiracular; en las cuales la presencia de cerdas y escamas posee importancia taxonómica. Las patas son largas, compuestas de coxa, trocánter, fémur, tibia y

cinco tarsómeros. El último tarso está generalmente provisto de un par de uñas, semejantes o diferentes entre sí y con presencia o no de dientes.

El abdomen está formado por ocho segmentos visibles, formados por una placa ventral (esternito) y una dorsal (tergito) y unidos por la pleura o membrana pleural, más dos segmentos modificados en ano y genitalia externa (Fig. 2).

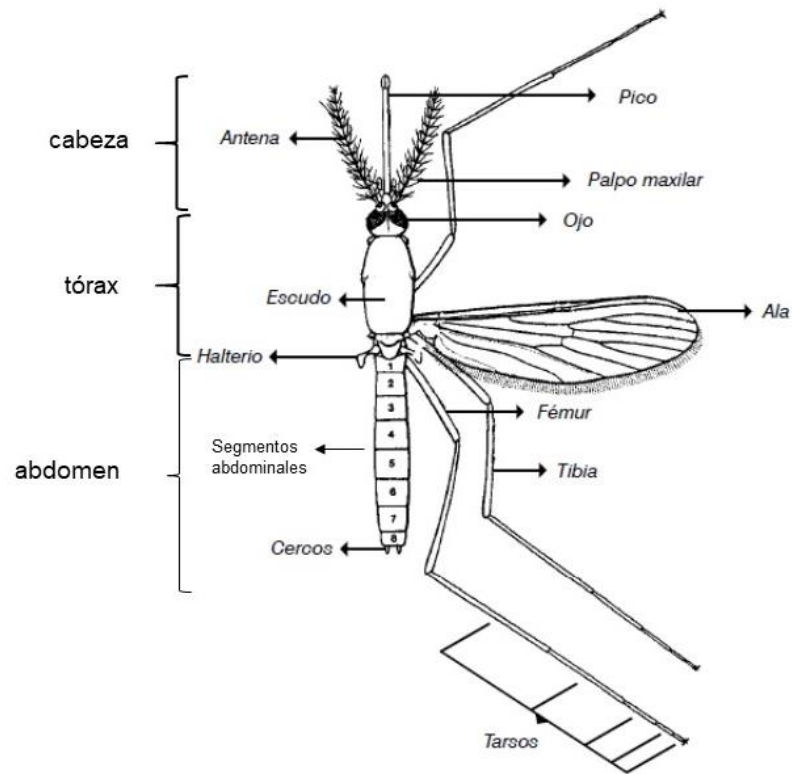


Figura 2. Morfología externa de un mosquito adulto. Extraído y modificado de Rossi & Almirón, 2004.

Ciclo de vida

Los mosquitos, al ser insectos holometábolos, pasan por cuatro estados durante su ciclo biológico: huevo, larva con cuatro estadios larvales (L1, L2, L3 y L4), pupa y adulto (Fig. 3). Parte de este ciclo biológico se desarrolla en el agua, la fase adulta representa la fase diferenciada y principalmente destinada a la reproducción y dispersión.

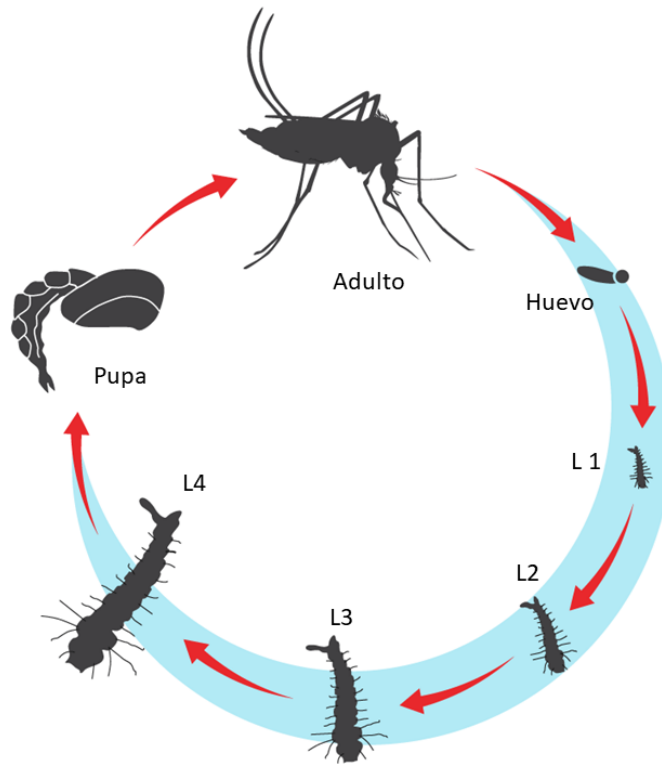


Figura 3. Ciclo de vida de mosquitos, estadios larvales (L1, L2, L3, L4). Tomado y modificado de <https://acervo.publico.pt/multimedia/infografia/zzzzzzika-185>

Huevo: en general son de contorno oval o elíptico, su tamaño varía de acuerdo a la especie (0,6 a 0,8 mm de longitud). Pueden ser colocados en la superficie del agua de manera individual (especies del género *Anopheles* Meigen) o en balsas (*Culex* Linnaeus, *Uranotaenia* Lynch Arribálzaga), adheridos a la vegetación acuática (*Mansonia* Blanchard), o colocados individualmente en lugares húmedos por fuera del medio líquido (*Aedes* Meigen, *Ochlerotatus* Lynch Arribálzaga, *Psorophora* Robineau-Desvoidy). El volumen de postura es muy variado, oscila entre 50 a 500 huevos, dependiendo fundamentalmente de la disponibilidad de sangre ingerida (Forattini, 1996). El momento del día elegido por la hembra para esta actividad parece ser las horas de baja luminosidad, realizando además múltiples ovoposiciones como estrategia de supervivencia.

En cuanto a la eclosión se pueden dividir en dos categorías: aquellos que eclosionan inmediatamente después del desarrollo embrionario (*Anopheles*, *Culex*, *Mansonia*, *Uranotaenia*) y los que presentan un periodo de reposo luego del desarrollo embrionario y que antecede a la eclosión (*Aedes* y *Psorophora*)

(Rossi & Almirón, 2003). Estos últimos son resistentes a la desecación y eclosionan cuando el agua los cubre.

El período de desarrollo embrionario es de uno a dos días en los huevos que eclosionan inmediatamente al término del desarrollo y varía de acuerdo a la especie y los factores del medio ambiente, sobre todo la temperatura, la humedad relativa, la presencia de sustancias en el medio líquido y la densidad en el criadero. En el caso de huevos con período de reposo posterior al desarrollo, la embriogénesis generalmente ocurre en un periodo de dos a cuatro días a temperaturas en el rango de 24 a 27°C. La supervivencia del huevo depende de una combinación de presiones selectivas como la desecación, depredación y congelación (Ponce *et al.*, 2004).

Con respecto a la selección de lugares para la ovoposición, en particular las hembras pertenecientes al género *Aedes* seleccionan tanto recipientes artificiales como naturales, pudiendo incluso distinguir criaderos con y sin presencia de la misma especie, prefiriendo los segundos (Grech & Ludueña-Almeida, 2016).

Larva: esta fase es acuática y de gran movilidad. El cuerpo de la larva está dividido en cabeza, tórax y abdomen, los dos primeros tagmas de aspecto globoso y el abdomen con una apariencia semi cilíndrica y dividido en nueve segmentos. Al final del cuerpo se encuentra el sifón respiratorio, con el cual rompen la tensión superficial del agua para captar aire de la superficie por los espiráculos. En los miembros de la sub familia Anophelinae no está desarrollado el sifón, y existe en su lugar un conjunto de placas esclerotizadas que conforman el aparato espiracular (Rossi & Almirón, 2003).

Para la alimentación poseen un aparato bucal masticador-rascador con mandíbulas quitinosas modificadas con estructuras en formas de cepillo que utilizan para filtrar detritos orgánicos suspendidos en el agua, o microorganismos como hongos, bacterias y protozoos (Consoli & Lourenço-De-Oliveira, 1994; Rossi & Almirón, 2004). Existen también larvas depredadoras pertenecientes a especies de los géneros *Toxorhynchites* Theobald, *Psorophora* y *Culex*.

El sistema digestivo está dividido en intestino anterior o estomodeo (faringe, esófago y proventrículo), tubo medio o mesenterón (ciegos gástricos y estómago o intestino medio) y tubo posterior o proctodeo (píloro, intestino

delgado, recto o colon y canal anal), cuyo inicio es coincidente con la presencia de los tubulos de Malpighi (Fig. 4).

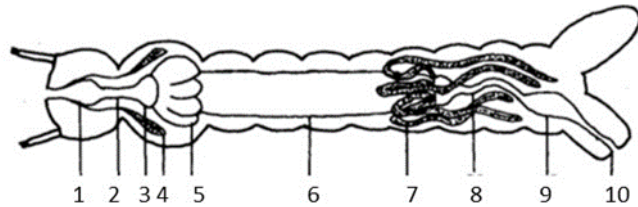


Figura 4. Esquema del sistema digestivo de una larva: 1 faringe, 2 esófago, 3 proventrículo, 4 glándula salivar, 5 ciegos gástricos, 6 intestino medio, 7 túbulos de Malpighi, 8 colon, 9 recto, 10 ano. Extraído de Consoli & Lourenço-De-Oliveira, 1994.

El cuerpo de la larva presenta alrededor de 222 pares de cerdas dispuestas de manera simétrica y que varían en tamaño y número de ramificaciones, su estudio se denomina quetotaxia (Fig. 5).

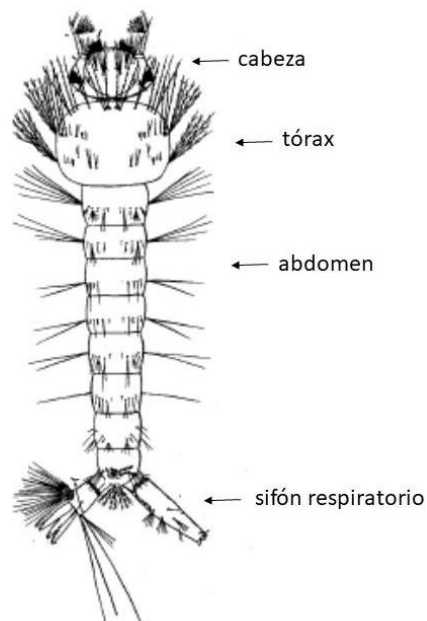


Figura 5. Larva de Culicidae. Se observan las cerdas del cuerpo y el sifón respiratorio al final del abdomen. Extraído de Consoli & Lourenço-De-Oliveira, 1994.

En la duración de esta fase del desarrollo influye la temperatura, el aporte de nutrientes y la densidad, por ejemplo las larvas de *Ae. albopictus* (Skuse), en laboratorio a 30°C se han desarrollado en seis días, y a 20°C en 13 días (Ponce *et al.*, 2004).

Pupa: durante esta fase acuática el mosquito no se alimenta y sufre profundas transformaciones que llevan a la formación del adulto con el consecuente cambio del medio hídrico al terrestre (Forattini, 1996). Morfológicamente el aspecto es semejante a una coma y en su cuerpo se pueden distinguir dos partes: el cefalotórax y el abdomen. En el cefalotórax existen dos estructuras tubulares llamadas trompas o trompetas respiratorias donde se abren los únicos espiráculos de la pupa (Consoli & Lourenço-De-Oliveira, 1994) (Fig. 6).

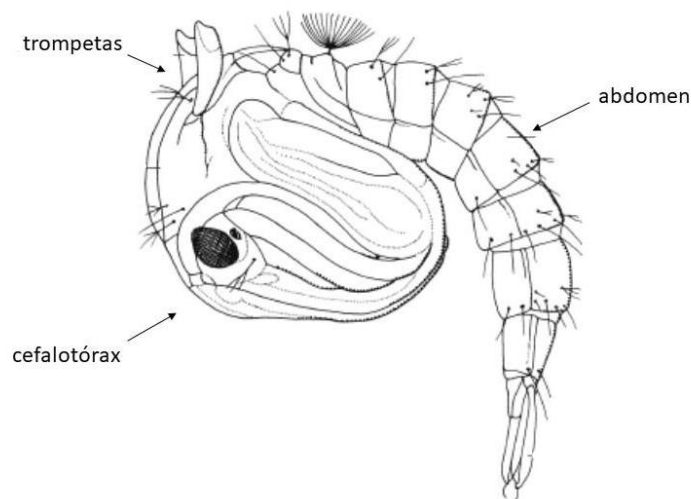


Figura 6. Pupa de Culicidae mostrando las principales divisiones del cuerpo. Extraído de Becker *et al.*, 2010.

A lo largo de esta fase se produce la eliminación de ciertos órganos larvales y formación de órganos de la fase adulta, gracias a células embrionarias que permanecieron indiferenciadas.

La duración de este estado puede ser de dos a cinco días, no resiste condiciones adversas (como la desecación del criadero) y no presenta quiescencia. Sin embargo para *Ae. albopictus* se observó que las mismas sobreviven hasta dos días a la desecación a una temperatura de 26°C y una humedad relativa del 87% (Ho *et al.*, 1972). En general el tamaño de las pupas

masculinas es menor que las femeninas, y la emergencia del adulto ocurre antes (Forattini, 1996; Ponce *et al.*, 2004; Forattini, 2002).

Adulto o imago: luego de la emergencia los mosquitos buscan lugares húmedos y sin corrientes de aire para reposar. En cuanto a la alimentación, los machos se alimentan de sustancias azucaradas como néctar y exudados de frutos, a partir de las cuales obtienen la energía necesaria para volar y aparearse con las hembras. Las hembras además de ingerir estas sustancias azucaradas necesitan ingerir sangre (hematofagia) para poder concluir su ciclo gonadotrófico, que consiste en la maduración de los huevos y la subsecuente postura. Las principales funciones de un mosquito adulto son la reproducción y dispersión; en general se considera que una hembra puede poner entre 100 y 300 huevos luego de una ingesta sanguínea. Para *Aedes aegypti* (Linnaeus) a lo largo de la vida de una sola hembra, y considerando múltiples ingestas sanguíneas, se ha registrado la puesta de hasta 750 huevos (Rossi & Almirón, 2003).

En cuanto a la dispersión del adulto podemos hablar de dos tipos, activa efectuada con esfuerzo propio del mosquito, o pasiva debido a factores independientes del mosquito como ser, corrientes de aire o transporte en diferentes tipos de vehículos (Rossi & Almirón, 2003). El alcance de vuelo de hembras de *Ae. albopictus* experimentalmente se determinó que es de 134 mts, alcanzando rara vez los 500 mts. (Ponce *et al.*, 2004). Sin embargo en un estudio realizado en Río de Janeiro (Brasil) se observó un rango de dispersión de 600 a 800 mts tanto para *Ae. albopictus* como para *Ae. aegypti* (Honório *et al.*, 2003).

Taxonomía y morfología de *Aedes* spp.

El género *Aedes* (Meigen) pertenece a la Subfamilia: Culicinae, Tribu: Aedini. Dentro de la subfamilia Culicinae las hembras en general presentan palpos maxilares cortos, y los machos frecuentemente más largos que la probóscide. En Argentina se encuentran 17 de los 19 géneros existentes, con un total de 246 especies. La mayor diversidad se encuentra en la zona noreste del país, donde se halla representado el 86,47% del total de las especies (Rossi, 2015; Stein *et al.*, 2018).

La tribu Aedini está representada por 47 especies en el país (Rossi, 2015). La gran mayoría de las especies incluidas en esta tribu presenta hábitos diurnos o crepuscular vespertino y son oportunistas al presentar una amplia gama de hospedadores, desde animales de sangre fría hasta de sangre caliente (Delatte *et al.*, 2010). La transitoriedad de los criaderos utilizados por los Aedini impone un desarrollo rápido de las fases larvales y pupa, ya que su ciclo debe ser completado antes de la evaporación total del agua del criadero (Consoli & Lourenço-De-Oliveira, 1994).

Los adultos del género *Aedes* se caracterizan por presentar el ápice del abdomen agudo con cerdas preespiculares ausentes; y bandas o grupos de escamas en posición basal en los tergos abdominales. El escudo posee cerdas visibles en el área prescutelar; escamas de forma variada, pero no lisas ni de color metálico; lóbulos antepronotales pequeños.

Aedes aegypti y *Ae. albopictus* pertenecen al subgénero *Stegomyia* Theobald. Los adultos de este subgénero de manera frecuente presentan ornamentaciones con manchas y diseños de escamas, tanto en el tórax como en las patas. Los palpos masculinos son largos y equivalen a los tercios de la longitud de la probóscide.

Aedes aegypti y *Ae. albopictus* presentan un tórax ennegrecido con ornamentaciones de manchas o diseños de escamas claras (blanco-plateadas). Dichas ornamentaciones se prolongan hasta el escutelo en donde predominan las escamas claras. Las patas son de aspecto rayado con bandas blancas (Consoli & Lourenço-De-Oliveira, 1994; Forattini, 1996). Morfológicamente se puede distinguir fácilmente a los adultos de ambas especies, *Ae. aegypti* es un mosquito oscuro, cuya tonalidad varía del marrón al negro. Las hembras presentan palpos maxilares con conjuntos de elementos claros; el clípeo posee dos mechones de escamas también blanco plateadas. La antena es filiforme con escamas plateadas en el toro. El tórax está recubierto de escamas oscuras y claras, con el escudo ornamentado con escamas blanco plateadas en forma de lira. Los adultos de *Ae. albopictus* son oscuros, con tonalidad negra. Los palpos maxilares de las hembras presentan conjuntos de elementos claros, y el clípeo está enteramente recubierto de escamas oscuras. Las escamas plateadas del escudo se ubican en una línea longitudinal media.

En cuanto a la morfología de las larvas, *Ae. aegypti* posee la cerda 7 de la cabeza simple. El tórax con espinas laterales muy evidentes; y el peine del segmento VIII esta constituido por dientes dispuestos en una sola hilera, cada uno de ellos con un espina central aguda, acompañada de otras menores dispuestas basal y bilateralmente; la brocha ventral está formada por cinco pares de cerdas. *Aedes albopictus* presenta un tórax con espinas laterales muy pequeñas; la cerda 7 de la cabeza es doble o triple. Los dientes del peine del segmento VIII son largos, agudos, y presentan en la base bilateralmente un pequeño diente (Forattini, 1996) (Fig. 7).

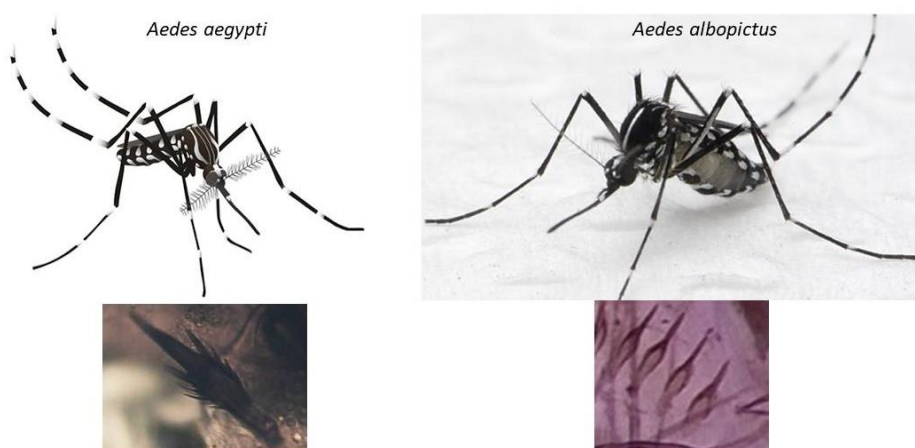


Figura 7. Características morfológicas distinguibles del tórax de *Aedes aegypti* y *Ae. albopictus* y espinas del peine del VIII segmento abdominal de la larva de ambas especies.

Importancia sanitaria

Dentro de los culícidos se encuentran especies que poseen importancia sanitaria por ser hospedadores y vectores de patógenos causantes de enfermedades tropicales. Entre dichas especies se encuentran *Aedes aegypti*, que fue identificado como vector de arbovirosis por primera vez a principios del siglo XX en Cuba (Souza-Neto, Powell, & Bonizzoni, 2019) y es el principal transmisor de los 4 arbovirus que han tenido mayor importancia en la salud humana en los últimos años, el virus de la fiebre amarilla (YFV), el virus del dengue (DENVs), el virus Zika (ZIKV) y el virus chikungunya (CHYKV) (Souza-Neto *et al.*, 2019); y *Aedes albopictus*, el cual es un reconocido vector del virus dengue y el virus de la encefalitis japonesa en Asia (Gratz, 2004). En condiciones

experimentales además se demostró que es competente para transmitir, al menos, 22 arbovirus, entre ellos, los cuatro serotipos del DENV, el YFV, el virus del Nilo Occidental (WNV), el ZIKV y el CHYKV (Gratz 2004, Reiter *et al.*, 2006, Vega *et al.*, 2014, Ruiling *et al.*, 2018).

A continuación se detallan los patógenos, las enfermedades más importantes y sus mosquitos vectores.

1. Enfermedades parasitarias

Paludismo o malaria: es una enfermedad que afecta a millones de personas en el mundo, en el año 2017 se han reportado 217 millones de casos en el mundo (OPS, 2019). Es causada por protozoos del género *Plasmodium* (Apicomplexa: Aconoidasida, las especies más peligrosas *P. falciparum* y *P. vivax*, transmitidos por mosquitos del género *Anopheles*. Es una enfermedad febril aguda, que puede provocar anemia y problemas respiratorios. En la región de las Américas existen 21 países con algún riesgo de transmisión de malaria. El último reporte de la Organización Panamericana de la Salud (2018) mostró que el 93 % de los casos se concentraron en seis países: Brasil, Colombia, Guyana, Haití, Perú y Venezuela. Con respecto a Argentina, ha sido declarada por la Organización Mundial de la Salud (OMS) libre de malaria durante el presente año, luego de demostrar la interrupción de la transmisión autóctona de la enfermedad desde el año 2011 (OPS, 2019).

Con respecto a los vectores en Argentina se han registrado históricamente los siguientes: en 1911 a *Anopheles (Anopheles) pseudopunctipennis* Th. (como el principal vector de la malaria en el noroeste de Argentina (Paterson, 1911). En 1927 se reportaron para el noreste de Argentina otras especies del subgénero *Anopheles* implicadas en la transmisión, *An. albitarsis* Lynch Arribálzaga y *An. argyritarsis* Robineau-Desvoidy (Shannon & del Ponte, 1927). En 1946 durante un brote epidémico en la provincia de Misiones se capturaron ejemplares de *An. darlingi* Root infectados (Lifshitz *et al.*, 1946).

Dirofilariasis: zoonosis parasitaria producida por nematodos del género *Dirofilaria*, siendo *D. immitis* (Leidy) la única especie reportada para Argentina. Este parásito afecta principalmente al perro y de manera accidental al hombre.

Con respecto a los vectores han sido encontrados con la infección natural *Ae. aegypti* y *Cx. pipiens* Linnaeus (Vezzani & Eiras, 2016).

2. Enfermedades por arbovirosis

Los arbovirus son virus que utilizan artrópodos como vectores, su nombre proviene de *ARthropod-BORne viruses*. Existen alrededor de 150 que causan enfermedades en humanos (Cleton *et al.*, 2012). Pueden ser amplificados por una amplia variedad de hospedadores, incluyendo aves y algunos mamíferos (equinos, roedores, primates y otros). El vector adquiere la infección cuando se alimenta de un hospedador virémico. Una vez en el intestino del artrópodo el virus infecta el epitelio intestinal y se replica en sus células. Posteriormente, luego de atravesar la barrera física de la lámina basal se dirige por la hemolinfa a las glándulas salivales donde se replica y acumula, transmitiéndose a otros hospedadores mediante la inoculación de saliva infectada. Los arbovirus pueden ser amplificados por una amplia variedad de hospedadores incluyendo aves y algunos mamíferos, como roedores, primates y equinos (Contigiani *et al.*, 2016) (Fig. 8).

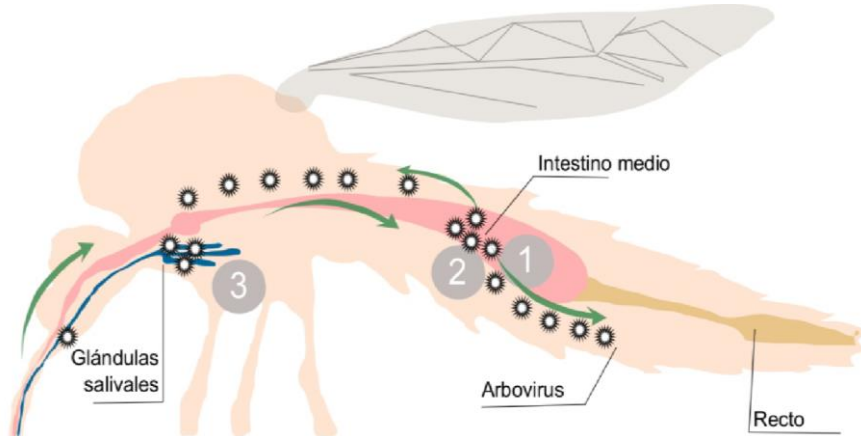


Figura 8. Proceso de infección por un arbovirus en un mosquito vector. Los arbovirus ingresan al vector durante la alimentación por vía oral. Las partículas virales presentes en la sangre ingerida deben unirse a las células del epitelio intestinal (1: barrera de infección del intestino). Una vez infectadas, el virus replica y debe escapar del intestino atravesando la lámina basal (2: barrera de escape del intestino). Una vez fuera del tubo digestivo, las partículas virales se dispersan por todo el organismo. Para poder completar el ciclo, las partículas virales deben infectar las glándulas salivales (3) y así poder ser transmitidos vectorialmente en el próximo acto de alimentación. Tomado de Contigiani *et al.*, 2016.

Las enfermedades por arbovirus están emergiendo/reemergiendo a nivel mundial: el virus chikungunya (CHIKV), el virus dengue (DENV), el virus de la fiebre amarilla (YFV), el virus de la encefalitis de Saint Louis (SLEV) y el virus Zika (ZIKV) son algunos ejemplos de este fenómeno. Entre los factores que propician esta emergencia se encuentran cambios ambientales antrópicos, cambios climáticos, expansión de la población humana a zonas selváticas, movimiento humano por transporte aéreo (Contigiani *et al.*, 2016). A continuación se detallan algunas de las enfermedades causadas por arbovirus:

Fiebre amarilla: es una enfermedad endémica de las zonas selváticas de África, América Central y Sur. Presenta dos ciclos de transmisión, urbano en el cual el principal hospedador es el hombre, y el vector *Ae. aegypti*. El segundo es el ciclo selvático, donde el hospedador principal es el mono aullador o carayá (*Alouatta*) en Argentina, y los vectores son mosquitos del género *Haemagogus* Williston y *Sabethes* Robineau-Desvoidy en Sudamérica. El hombre es infectado por mosquitos virémicos cuando se introduce accidentalmente en el ciclo selvático. El espectro clínico varía desde una enfermedad febril no específica a una enfermedad con desenlace fatal (Contigiani *et al.*, 2016).

La última ola amarílica reportada en monos en Argentina tuvo lugar en los años 2008-2009 afectando las poblaciones silvestres de mono aullador, estas epizootias también afectaron poblaciones de Brasil y Paraguay (Contigiani *et al.*, 2016). En los últimos años, en la región de las Américas, se han notificado casos en seis países: Bolivia, Brasil, Colombia, Ecuador, Guayana Francesa y Perú. Sólo Brasil, entre el segundo semestre de 2016 a junio 2017 registró 777 casos, 261 defunciones y 1.659 epizootias (OPS, 2019). Los vectores reconocidos en Brasil son *Haemagogus spegazzini* Williston y *Hg. leucocelaenus* (Dyar & Shannon).

Dengue: es una enfermedad con síntomas similares a una gripe, causada por el virus dengue (DENV), del cual existen 4 serotipos: 1, 2, 3 y 4. Cualquier serotipo puede producir formas graves de la enfermedad, aunque los serotipos 2 y 3 se han asociado de manera más frecuente a casos graves o muerte. Se transmite a través de la picadura de *Ae. aegypti*, aunque en otros continentes *Ae. albopictus* también ha actuado como vector (Contigiani *et al.*, 2016).

Se presenta en climas tropicales, sub tropicales y templados, sobre todo en áreas urbanas y semi-urbanas se ha convertido en los últimos años en la principal enfermedad viral transmitida por mosquitos en el mundo, siendo reportados 560.586 casos en el 2018 (OMS, 2019). En Argentina la última gran epidemia ha ocurrido en el periodo transcurrido desde verano 2015-2016 hasta el otoño de 2016 con 60.000 casos confirmados, siendo la provincia de Misiones la que registró el mayor porcentaje (80%) (Ministerio de Salud de la Nación, 2016).

Chikungunya: causada por el virus chikungunya (CHYKV), es una enfermedad febril aguda con dolores articulares y erupción cutánea. La enfermedad ocurre sobre todo en África, Asia y el subcontinente Indio. Sin embargo en el año 2015 hubo un gran brote en las Américas con 47.680 casos confirmados. Es transmitida por *Ae. aegypti* y *Ae. albopictus* (OMS, 2109).

Zika: causada por el virus Zika (ZIKV), en humanos provoca sintomatología similar a aquella causada por DENV y CHIKV, diferenciándose por la alta frecuencia de conjuntivitis, poco dolor articular y baja fiebre (<38 °C) (Contigiani *et al.*, 2016). La infección contraída durante el embarazo es causante de microcefalia y otras malformaciones congénitas. Además es un desencadenante del síndrome de Guillain-Barré, neuropatía y mielitis, sobre todo en adultos y niños mayores (OMS, 2019). El mantenimiento en nichos selváticos ocurre a través de la transmisión vectorial por mosquitos del género *Aedes* y primates u otros mamíferos (Hayes, 2009). En Brasil se detectó un gran brote en 2015, con más de 30 mil casos confirmados (OMS, 2019).

Microorganismos asociados a insectos

Además de los organismos patógenos al hombre y a los animales, los insectos están asociados a una amplia diversidad de microorganismos específicos de insectos (virus, bacterias, hongos y protozoos) con una variedad de relaciones simbióticas que incluyen el comensalismo, mutualismo y parasitismo (Lacey, 2012).

Los microorganismos pueden estar presentes interna o externamente en el cuerpo de los insectos. La mayoría de las relaciones ecológicas entre microorganismos e insectos son constructivas, resultando en beneficios para los insectos, los microorganismos o ambos. Por ejemplo los que se encuentran en el interior del cuerpo de los insectos hallan condiciones favorables para su desarrollo, como refugio y alimentos. Pueden localizarse en el aparato reproductivo, ojos, espiráculos, tráquea, ciegos gástricos, hemocele, interior del intestino o en el interior de las células. Algunas bacterias y levaduras forman parte de la flora intestinal de los insectos confiriendo un mecanismo de defensa, aunque en situaciones ligadas a estrés, falta de agua o daños mecánicos pueden tornarse patogénicos.

En el caso de un microorganismo patógeno, éste debe superar las defensas inmunitarias del huésped y acceder al tejido apropiado antes de comenzar su reproducción, característica específica de cada especie denominada tropismo celular; que puede variar en especificidad desde uno a varios tipos de tejidos, o inclusive abarcar todos los tejidos del hospedador. Existen también patógenos que invaden diferentes tejidos en diferentes hospedadores o momentos del desarrollo (Katsuma *et al.*, 2011).

La patogenicidad no solamente se relaciona con la muerte del individuo, sino también con efectos sobre la biología y fisiología de los hospedadores, como alteraciones en el ciclo de vida, reducción de la fecundidad y la longevidad. Además de las características propias del patógeno, son muy importantes las características del huésped para determinar el resultado final de una infección y, la interacción con los factores bióticos y abióticos del ambiente. Existen patógenos generalistas con una amplia variedad de hospedadores; y otros que pueden tener una única especie como hospedador, especies primarias o intermedias o especies muy emparentadas.

La dispersión de los patógenos en el ambiente puede ocurrir a través del cuerpo de los hospedadores infectados o como etapas infectivas liberadas al ambiente, disponibles para invadir nuevos huéspedes susceptibles (Solter & Becnel, 2018).

Rutas de ingreso al insecto

En el caso de los virus, el mecanismo típico de entrada es la ingestión por el hospedador. La invasión de las células por los viriones implica un entorno intestinal específico (pH, enzimas, receptores de membrana de las células epiteliales). Algunos virus pueden transmitirse de la hembra infectada a la descendencia (transmisión vertical).

Las bacterias son ingeridas o invaden el cuerpo del hospedador a través de heridas en los tejidos, aunque la transmisión vertical es inusual ocurre, por ejemplo en *Wolbachia* (Solter & Becnel, 2018).

Los clados fúngicos Hypocreales (Ascomycota) y Entomophthoromycotina, que incluyen a los patógenos de invertebrados, producen esporas llamadas conidios del cual crece un tubo germinal que secreta las enzimas necesarias para que el hongo penetre mecánicamente y se adhieren a la cutícula para crecer en el cuerpo del insecto (Solter & Becnel, 2018).

Los mecanismos invasivos de los protistas incluyen la ingestión de ooquistes y, la entrada a la cutícula a través de aberturas. En el caso de los microsporidios la mayoría infecta a los hospedadores por vía oral, las esporas infecciosas germinan en la luz del intestino medio e inyectan su contenido en las células (Solter & Becnel, 2018).

Microorganismos hallados en Culícidos

Dentro de los entomopatógenos que infectan culícidos se encuentran los hongos, como *Leptolegnia chapmani* (Seymour, 1984) que fue aislado por primera vez de *Ae. triseriatus* (Say). Es un hongo patógeno acuático que ha demostrado afectar a larvas de varias especies de mosquitos, por ejemplo *Culex* spp., *Anopheles* spp., *Haemagogus* spp., *Ae. aegypti* y *Ae. albopictus* (López Lastra *et al.*, 2004).

Los microsporidios (Microsporidia: Amblyosporidae) representan uno de los grupos más grandes y diversos de organismos parásitos asociados a poblaciones naturales de mosquitos. Son parásitos intracelulares obligados de larvas y adultos, a los que infectan vía oral o transovárica, por ejemplo *Amblyospora* Hazard & Oldacre, *Vavraia culicis* (Weiser), *Edhazardia aedis*

(Kudo). En las últimas décadas ha existido en el mundo un interés en su utilización como controladores de poblaciones de mosquitos, por ello los estudios se han centralizado en sus efectos sobre la fecundidad y longevidad de los mosquitos adultos (Agnew *et al.*, 1999; Becnel & Johnson, 2000; Andreadis, 2007; Duncan *et al.*, 2015). Existen trabajos como el de Rivero *et al.* (2007) donde mostraron que las larvas infectadas con microsporidios presentan menos lípidos, azúcares y glucógeno que las no infectadas, resultado de la alta demanda metabólica que estos parásitos imponen a sus huéspedes, retrasando el desarrollo hacia la etapa de pupa.

Los mosquitos también son hospedadores de protozoos del género *Ascogregarina* (syn. *Monocystis* von Stein, 1848, *Lankesteria* Mingazzini, 1891 y *Ascocystis* Grasse, 1953) (Apicomplexa), dentro del cual existen 9 especies que parasitan mosquitos (ver capítulo 3).

Los virus que causan enfermedades en mosquitos son parásitos intracelulares obligados que a menudo llevan a la muerte del organismo (Becnel & White, 2007). Pertenecen a cuatro grandes grupos. Los más frecuentes son los Baculovirus (Baculoviridae: Nucleopolyhedrovirus) y los virus de polihedrosis citoplasmática (Reoviridae: Cypovirus). Los otros son los densovirus (Parvoviridae: Brevidensovirus) y los iridovirus (Iridoviridae: Chloriridovirus).

La familia Baculoviridae se agrupa en dos géneros *Nucleopolyhedrovirus* y *Granulovirus*. Los hallados en mosquitos pertenecen al primer grupo y se han encontrado en los géneros *Aedes*, *Anopheles*, *Culex*, *Ochlerotatus*, *Psorophora*, *Uranotaenia* y *Wyeomyia* (Murphy *et al.* 1995). Invaden específicamente células del intestino medio de larvas (Becnel *et al.*, 2001). Los virus iridiscentes de mosquitos pertenecen al género *Chloriridovirus* (Reoviridae). Estos virus de ADN se replican y ensamblan en células del cuerpo graso. El mayor número de densovirus de mosquitos pertenecen al género *Brevidensovirus*, en este caso la mayoría de los tejidos del hospedador son susceptibles, excepto las células del intestino medio. Los Reoviridae se han aislado en 20 especies diferentes de mosquitos. Los cuerpos de oclusión se acumulan en el citoplasma de las células del intestino medio, observándose un color blanquecino o iridiscente. Las infecciones se localizan en los ciegos gástricos o porción posterior del estómago (Federici, 1985; Becnel & White, 2007).

En los años recientes se ha descubierto que existe una comunidad de bacterias que viven en el intestino o sobre la cutícula de mosquitos. Estos microorganismos residentes pueden promover la condición física del insecto al contribuir en la nutrición, por ejemplo el aporte de aminoácidos esenciales, vitamina B; además pueden protegerlo contra patógenos o parásitos sintetizando toxinas específicas o modificando el sistema inmune. En la mayoría de los insectos el hábitat más propicio para el desarrollo de la microbiota es el intestino posterior al carecer de las enzimas digestivas del intestino medio (Douglas, 2015). Análisis moleculares han determinado que el Phylum dominante en el intestino de *An. stephensi* Liston, *An. gambiae* Giles, *Ae. aegypti*, *Ae. triseriatus* y *Cx. quinquefasciatus* son las Proteobacterias (Minard *et al.*, 2013).

Aunque también existen bacterias como *Wolbachia* que afectan principalmente las gónadas de sus hospedadores, donde además de provocar alteraciones en la reproducción se asegura de transmitirse a la descendencia. Se ha descubierto además que tiene efectos indirectos que interfieren en la replicación y diseminación de patógenos, modificando la capacidad del mosquito como vector (Moreira *et al.*, 2009).

Estudios en Argentina

Entre los estudios realizados en Argentina se encuentran: el registro más austral del hongo *Leptolegnia chapmani* infectando larvas de *Ae. albifasciatus* (Macquart) (López Lastra *et al.*, 1999); estudios de rango de hospederos de un aislado argentino de *Leptolegnia chapmani*, el cual presenta un gran potencial como agente de control biológico debido a su especificidad para colonizar únicamente mosquitos y por lo tanto presentar poco riesgo para organismos acuáticos no blanco (López Lastra *et al.*, 2004). Asimismo se han realizado estudios sobre los efectos de la longevidad, supervivencia e infectividad de dicho aislado (Pelizza *et al.*, 2008).

Los estudios con microsporidios incluyen la detección de especies de *Amblyospora* spp. y *Parathelohania* sp. en culícidos de las provincias de Misiones y Buenos Aires; estudios de transmisión horizontal de *Amblyospora albifasciati*; ciclo de vida de *Amblyospora camposi* en *Cx. renatoi* Lane &

Ramallho (Micieli & García, 1997; Micieli et al., 2000; Micieli et al., 2001; Micieli et al., 2007).

Se han realizado trabajos con el protozoo *Ascogregarina culicis* que incluyen prevalencia e intensidad de infección (Dellapé et al., 2005; Vezzani & Wisnivesky, 2006; Albicocco & Vezzani, 2009).

Con virus de mosquitos en los últimos tiempos se han realizado trabajos que incluyen la detección de un virus iridiscente en *Cx. pipiens* L (Muttis et al., 2012; Muttis et al., 2013). El aislado de una nueva cepa de *Culex Flavivirus* (CxFV) a partir de *Culex* sp. de la provincia de Corrientes (Goenaga et al., 2014).

Los estudios realizados con bacterias de culícidos incluyen el aislado de una cepa nativa de *Bacillus thuringiensis* y la caracterización y clonación de una nueva proteína (Cry) con actividad larvicida contra *Ae. aegypti* (Beron et al., 2005; Berón & Salerno, 2006; Berón & Salerno, 2007). Tranchida et al. (2012) en un estudio de patógenos de *Cx. pipiens* en áreas sub urbanas de la ciudad de La Plata aislaron e identificaron la α proteobacteria del género *Novispirillum itersonii*. Cepas de bacterias formadoras de esporas fueron aisladas de larvas muertas de *Cx. pipiens* en La Plata siendo *Lysinibacillus sphaericus* la que presentó el mayor efecto larvicida sobre esta especie de mosquito (Tranchida et al., 2011). Díaz-Nieto et al. (2016) evaluaron la tasa de supervivencia de colonias de *Cx. pipiens* expuestas a microorganismos en condiciones de laboratorio, y entre los resultados se destaca la preferencia de ovoposición en aquellos medios que contenían las cepas nativas de las bacterias *Klebsiella* sp. y *Aeromonas* sp.

Con la bacteria *Wolbachia* se realizaron trabajos sobre los niveles somáticos en *Cx. quinquefasciatus* y *Cx. pipiens* y la resistencia a la infección del virus del Nilo Occidental (Micieli & Glaser, 2014). Recientemente se determinó la prevalencia de infección de cepas de *Wolbachia* en *Ae. albopictus* en la localidad de Puerto Iguazú, Misiones (Chuchuy et al., 2018).

BIBLIOGRAFÍA

- Achinelly M. F. & Micieli M. V. (2016). Entomonematodos como agentes de control biológico de mosquitos en Argentina. In N. S. C Berón, R Campos, R Gleiser, L Díaz Nieto, O Salomon (Ed.), *Investigaciones sobre mosquitos de Argentina* (pp. 275-283).
- Agnew, P., Bedhomme, S., Haussy, C., & Michalakis, Y. (1999). Age and size at maturity of the mosquito *Culex pipiens* infected by the microsporidian parasite *Vavraia culicis*. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 266(1422), 947–952. <https://doi.org/10.1098/rspb.1999.0728>
- Becnel, J. J., & Johnson, M. A. (2000). Impact of *Edhazardia aedis* (Microsporidia: Culicosporidae) on a seminatural population of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Biological Control*, 18(1), 39–48. <https://doi.org/10.1006/bcon.1999.0805>
- Becnel, J. J., & White, S. E. (2007). Mosquito pathogenic viruses--the last 20 years. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 23(2 Suppl), 36–49. <https://doi.org/10.2987/8756-971X> (2007)23[36:MPVLY]2.0.CO;2
- Becnel, J. J., White, S. E., Moser, B. A., Fukuda, T., Rotstein, M. J., Undeen, A. H., & Cockburn, A. (2001). Epizootiology and transmission of a newly discovered baculovirus from the mosquitoes *Culex nigripalpus* and *C. quinquefasciatus*, 275–282.
- Berón, C. M., & Salerno, G. L. (2007). Cloning and characterization of a novel crystal protein from a native *Bacillus thuringiensis* isolate highly active against *Aedes aegypti*. *Current Microbiology*, 54(4), 271–276. <https://doi.org/10.1007/s00284-006-0299-8>
- Camino, N. B., Gonzalez, S. E., & Reboredo, G. R. (2015). Biodiversidad de mermítidos (nematoda, mermithidae) parasitoides de larvas de dípteros acuáticos (Simuliidae, Culicidae y Chironomidae) en Argentina. *Neotropical Helminthology* 9(1), 65–71.
- Consoli, R. A., & Lourenço-De-Oliveira, R. (1994). *Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil*. (Fiocruz, Ed.), *Cadernos de Saúde Pública* (Vol. 11). Rio de Janeiro. <https://doi.org/10.1590/s0102-311x1995000100027>

Contigiani M. S., Díaz LA, Spinsanti L. I., Tauro L.B. (2016). Arbovirus. In N. S. C Berón, R Campos, R Gleiser, L Díaz Nieto, O Salomon (Ed.), *Investigaciones sobre mosquitos de Argentina* (pp. 157-178).

Delatte, H., Desvars, A., Bouetard, A., Bord, S., Gimonneau, G., Vourc'h, G., & Fontenille, G. (2010). Blood-Feeding Behavior of *Aedes albopictus*, a Vector of Chikungunya on La Reunion. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases* 10(3), 249-258.

Douglas, A. E. (2015). Multiorganismal Insects: Diversity and Finction of Resident Microorganisms. *Annu Rev Entomol*, 60, 17–34. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-010814-020822>.

Duncan, A. B., Agnew, P., Noel, V., & Michalakis, Y. (2015). The consequences of co-infections for parasite transmission in the mosquito *Aedes aegypti*. *Journal of Animal Ecology*, 84(2), 498–508. <https://doi.org/10.1111/1365-2656.12302>

Grech M & Ludueña-Almeida F. F. (2016). Mosquitos que crían en microambientes artificiales. In N. S. C Berón, R Campos, R Gleiser, L Díaz Nieto, O Salomon (Ed.), *Investigaciones sobre mosquitos de Argentina* (pp. 142-155).

Katsuma, S., Kobayashi, J., Koyano, Y., Matsuda-Imai, N., Kang, W., & Shimada, T. (2011). Baculovirus-Encoded Protein BV/ODV-E26 Determines Tissue Tropism and Virulence in Lepidopteran Insects. *Journal of Virology*, 86(5), 2545–2555. <https://doi.org/10.1128/jvi.06308-11>

Lacey, L. A. (2012). *Manual of techniques in Invertebrate Pathology*. (L. A. Lacey, Ed.) (Second ed). Academic Press.

Laurito M. & Stein M. (2016). Taxonomía clásica de mosquitos de Argentina: estado actual y proyecciones. In N. S. C Berón, R Campos, R Gleiser, L Díaz Nieto, O Salomon (Ed.), *Investigaciones sobre mosquitos de Argentina* (pp. 22-32).

Lifshitz J., Umana C.A., Vergara J. J., Heredia R.L. 1946. Anal del Instituto de Medicina Regional. Universidad Nacional de Tucumán. 349 pp.

López Lastra, C. C., Scorsetti, A. C., Marti, G. A., & García, J. J. (2004). Host range and specificity of an Argentinean isolate of the aquatic fungus *Leptolegnia*

chapmanii (Oomycetes: Saprolegniales), a pathogen of mosquito larvae (Diptera: Culicidae). *Mycopathologia*, 158(3), 311–315. <https://doi.org/10.1007/s11046-005-0498-z>

López Lastra, C. C., Steciow, M. M., & García, J. J. (1999). Registro más austral del hongo *Leptolegnia chapmanii* (Oomycetes: Saprolegniales) como patógeno de larvas de mosquitos (Diptera: Culicidae). *Revista Iberoamericana de Micología*, 16, 143–145.

Mieli, M. V., & Glaser, R. L. (2014). Somatic *Wolbachia* (Rickettsiales: Rickettsiaceae) Levels in *Culex quinquefasciatus* and *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) and Resistance to West Nile Virus Infection. *Journal of Medical Entomology*, 51(1), 189–199. <https://doi.org/10.1603/me13152>

Mieli, M. V., & García, J. J. (1997). Parasitismo por microsporidios (Microspora) en tres especies de mosquitos (Diptera: Culicidae) de la Argentina. *Revista de Biología Tropical*, 44–45(1–3), 635–639.

Mieli, M. V., Garcia, J. J., & Andreadis, T. G. (2001). Epizootiological studies of *Amblyospora albifasciati* (Microsporidiida: Amblyosporidae) in natural populations of *Aedes albifasciatus* (Diptera: Culicidae) and *Mesocyclops annulatus* (Copepoda: Cyclopidae) in a transient floodwater habitat. *Journal of Invertebrate Pathology*, 77(1), 68–74. <https://doi.org/10.1006/jipa.2000.4995>

Mieli, M. V., Marti, G. A., García, J. J., Tranchida, M. C., & Becnel, J. J. (2007). Epizootiological studies of *Amblyospora camposi* (Microsporidia: Amblyosporidae) in *Culex renatoi* (Diptera: Culicidae) and *Paracyclops fimbriatus fimbriatus* (Copepoda: Cyclopidae) in a bromeliad habitat. *Journal of Invertebrate Pathology*, 94(1), 31–37. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2006.08.004>

Mieli, M. V., Garcia, J. J., & Becnel, J. J. (2000). Life Cycle and Description of *Amblyospora camposi* n. sp. (Microsporidia: Amblyosporidae) in the Mosquito *Culex renatoi* (Diptera, Culicidae) and the Copepod *Paracyclops jimbriatus jimbriatus* (Copepoda, Cyclopidae), 47, 575–580.

Ministerio de Salud de la Nación. 2016. BIV N°336. Disponible en: <http://www.msal.gob.ar/index.php/home/boletin-integrado-de-vigilancia> [Acceso: Marzo, 2019].

Moreira, L. A., Iturbe-Ormaetxe, I., Jeffery, J. A., Lu, G., Pyke, A. T., Hedges, L. M., ... O'Neill, S. L. (2009). A *Wolbachia* Symbiont in *Aedes aegypti* Limits Infection with Dengue, Chikungunya, and *Plasmodium*. *Cell*, 139(7), 1268–1278. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.11.042>

Muttis, E., Micieli, M. V., J, J., & García. (2013). *Culex pipiens* affected by joint infection of a mosquito iridescent virus and *Strelkovimermis spiculatus*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 114(3), 295–297. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2013.08.010>

Muttis, E., Miele, S. A. B., Belaich, M. N., Micieli, M. V., Becnel, J. J., Ghiringhelli Pablo D, & García, J. J. (2012). First record of a mosquito iridescent virus in *Culex pipiens* L. (Diptera: Culicidae). *Arch Virol*, 157, 1569–1571. <https://doi.org/10.1007/s00705-012-1302-2>

Paterson G. C. 1911. Las fiebres palúdicas en Jujuy. An Depto Nac Hig. 18: 29-57.

Nota descriptiva Informe mundial sobre el paludismo 2018. Organización Mundial de la Salud. <https://www.who.int/malaria/media/world-malaria-report-2018/es/> [Acceso: Marzo, 2019].

Pelizza, S. A., López Lastra, C. C., Becnel, J. J., Humber, R. A., & García, J. J. (2008). Further research on the production, longevity and infectivity of the zoospores of *Leptolegnia chapmanii* Seymour (Oomycota: Peronosporomycetes). *Journal of Invertebrate Pathology*, 98(3), 314–319. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2008.04.006>

Ponce, G., Flores, A. E., Badii, M. H., & Fernández, I. (2004). Bionomía de *Aedes albopictus* (Skuse). *Revista Salud Publica y Nutrición*, 5(12), 17.

Rivero, A., Agnew, P., Bedhomme, S., Sidobre, C., & Michalakis, Y. (2007). Resource depletion in *Aedes aegypti* mosquitoes infected by the microsporidia *Vavraia culicis*. *Parasitology*, 134(10), 1355–1362. <https://doi.org/10.1017/S0031182007002703>

Rossi, G. C., & Almirón, W. R. (2004). *Clave ilustrada para la identificación de larvas de mosquitos de interés sanitario encontradas en criaderos artificiales en la Argentina Rossi*, (Vol. 16). <https://doi.org/10.1177/0897190003257626>

Rossi, G. C. (2015). Annotated checklist, distribution, and taxonomic bibliography of the mosquitoes (Insecta: Diptera: Culicidae) of Argentina. *Check List*, 11(4), 1–15. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001963>

Shannon R.C. & Del Ponte E. 1927. Informe sobre una investigación preliminar sobre *Anopheles* del río Alto Paraná en la Argentina. *Rev Inst. Bacteriol.* 4: 706-723.

Seymour, R. L. (1984). *Leptolegnia chapmanii*, an Oomycete Pathogen of Mosquito Larvae. *Mycologia*, 76(4), 670–674.

Stein, M., Alvarez, C. N., Alonso, A. C., Bangher, D. N., Willener, J. A., & Campos, R. E. (2018). New records of mosquitoes (Diptera: Culicidae) found in phytotelmata in Northern Argentina. *Zootaxa*, 4399(1), 87–100.

Stein, M., Rossi, G. C. & Almirón, W. R. (2016). Distribución geográfica de Culicidae de Argentina. In N. S. C Berón, R Campos, R Gleiser, L Díaz Nieto, O Salomon (Ed.), *Investigaciones sobre mosquitos de Argentina* (pp. 47–56).

Tranchida, M. C., Riccillo, P. M., Rodriguero, M. S., García, J. J., & Micieli, M. V. (2012). Isolation and identification of α -proteobacteria from *Culex pipiens* (Diptera Culicidae) larvae. *Journal of Invertebrate Pathology*, 109(1), 143–147. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2011.10.007>

OBJETIVOS

Los estudios realizados en Argentina relacionados con los parásitos de mosquitos de interés sanitario son escasos, y corresponden mayoritariamente a la región templada del país. El desarrollo de estas investigaciones que incluyen la distribución espacio temporal de estas especies vectores generará conocimientos a nivel local que permitirá integrarlos en programas de control más efectivos. De allí los objetivos planteados:

Objetivo General:

Contribuir al conocimiento de la ecología de los parásitos hallados en poblaciones naturales simpátricas de *Aedes aegypti* y *Ae. albopictus* en Eldorado, Misiones

Objetivos específicos:

1. Conocer la distribución estacional de *Aedes aegypti* y *Ae. albopictus* en la localidad de Eldorado, Misiones.
2. Determinar características físicas de los criaderos y los criaderos predominantes en los que estas dos especies se hallan.
3. Identificar los organismos parásitos hallados en especies de mosquitos invasivas: *Aedes aegypti* y *Ae. albopictus*.
4. Determinar la prevalencia de infección y la estacionalidad de los patógenos hallados sobre las poblaciones naturales de ambas especies vectores de patógenos.
5. Determinar las relaciones entre los parásitos hallados, las abundancias de *Ae.aegypti* y *Ae.albopictus* y las características de los criaderos donde se las encuentra.

SECCION I

Ecología de *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus*
(Diptera: Culicidae) de la localidad de Eldorado,
Misiones

INTRODUCCIÓN

Aedes aegypti (L.) y *Aedes albopictus* (Skuse) pertenecen al subgénero *Stegomyia*, grupo de aedinos originarios del viejo mundo, especies que han sido introducidas en la región Neotropical gracias al desarrollo comercial. Originalmente eran especies propias de huecos de árboles adaptadas actualmente a los recipientes artificiales y al hábitat urbano (Forattini, 2002; Gould *et al.*, 2017)

A nivel mundial son consideradas especies invasoras o invasivas (Juliano & Lounibos, 2005). El término “invasivo” se aplica a una especie introducida a un área que ha incrementado su número y se ha expandido, generando un impacto potencial en las especies y ecosistemas nativos, o en las actividades humanas. Dichos impactos de las especies invasivas se producen principalmente a través de interacciones bióticas, que incluyen la depredación, el parasitismo, la competencia interespecífica y los efectos sobre la salud humana y animal. Los efectos perjudiciales provocados por los mosquitos sobre las especies o ecosistemas residentes están más relacionados a la fase acuática de su ciclo de vida, y el impacto sobre la salud humana y de otros vertebrados se relaciona con la fase adulta (Juliano & Lounibos, 2005).

Las especies de mosquitos invasivos como *Ae. aegypti* y *Ae. albopictus* presentan ciertas características: huevos resistentes a la desecación, que ayudaría en el transporte y dispersión de los mismos; capacidad de desarrollarse en recipientes pequeños brindados por el hombre (además de recipientes naturales como son los huecos de árboles, bromélias); colonización de ambientes antrópicos (urbano, sub urbano, doméstico) (Juliano & Lounibos, 2005).

Biología y distribución geográfica de *Aedes aegypti* (L.) y *Ae. albopictus* (Skuse) (Diptera: Culicidae)

La distribución geográfica y la supervivencia de las especies están influenciadas por las condiciones ambientales como la temperatura, la luz, humedad; tanto a escala regional como local. Entre los factores asociados específicamente a mosquitos se encuentran los climáticos, la modificación del

ambiente por el hombre con fines productivos, el transporte, las actividades comerciales y las conductas humanas. Las conductas del hombre influyen sobre todo en aquellas especies adaptadas a vivir en un ambiente urbano, y que utilizan hábitats artificiales como sitio de cría, ya que la ovoposición en recipientes artificiales, como ser neumáticos, recipientes de diferentes materiales (vidrio, plástico, metal) favorece la dispersión pasiva de los huevos a través del transporte terrestre, aéreo o marítimo, y por lo tanto la expansión del área de distribución (Stein *et al.*, 2016).

***Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus)**

Aedes aegypti posee un comportamiento antropofílico y está presente principalmente en el interior de domicilios en áreas urbanas (Forattini, 2002; Heinisch *et al.*, 2019a). La alimentación selectiva y frecuente, por sangre humana de las hembras, acompañada de la baja preferencia por fuentes azucaradas vegetales estaría relacionada al estilo de vida antropofílico de esta especie (Harrington, *et al.*, 2001). La domiciliación pareciera haber evolucionado en el Norte de África cuando el ambiente se volvió más árido, provocando que una población aislada de la especie se viera obligada a adaptarse a estas nuevas condiciones secas mediante la reproducción en recipientes provistos por el hombre (Petersen, 1977). En la actualidad se reproduce en todo tipo de recipiente doméstico y peridoméstico que contenga agua dulce, incluidos floreros, tanques de agua, latas, neumáticos, etc. (Díaz-Nieto *et al.*, 2013).

La distribución de *Ae. aegypti* está concentrada en las regiones tropicales y sub tropicales del mundo, entre los paralelos de 45° de latitud norte y 40° de latitud sur, aunque puede encontrarse fuera de esos límites, difícilmente pueda mantenerse como una población estable. Esta especie se cree que emigró de África Occidental al nuevo mundo en los siglos XV al XVII a bordo de barcos de esclavos (Lounibos, 2002). En la fig. 1 se muestra la distribución global realizada con 19.930 datos de posición geográfica por Kraemer *et al.* (2015).



Figura 1. Distribución mundial de *Aedes aegypti* tomado de Kraemer *et al.* (2015).

Distribución en Argentina

Aedes aegypti fue considerado erradicado de Argentina en el año 1964, (Carcavallo & Martínez 1968) después de una fuerte campaña iniciada en 1947 en esta región del mundo (Bejarano 1979; PAHO 1994). Para el año 1986 se reportó la primera re infestación en las provincias de Formosa y Misiones y en 1991 ya se lo había detectado en la provincia de Buenos Aires (Grech *et al.*, 2010). Actualmente se distribuye a lo largo de latitudes templadas y subtropicales llegando hasta la provincia de Neuquén, con diferentes patrones estacionales, asociados a fluctuaciones de variables meteorológicas como las temperaturas y las precipitaciones (Stein *et al.*, 2005; Vezzani & Carbajo, 2008; Grech *et al.*, 2012; Díaz-Nieto *et al.*, 2013; Muttis *et al.*, 2018)

Los estudios de estructura genética realizados en nuestro país han puesto de manifiesto que existieron múltiples introducciones de *Ae. aegypti* a partir de subpoblaciones genéticamente diferentes. Además se han podido reconstruir patrones de colonización hacia nuestro país desde la re-introducción de la especie en el año 1986 concluyendo que el haplotipo predominante en el este, noreste y centro de Argentina, lo es también en Brasil y Paraguay. Mientras que el predominante en Bolivia se encuentra con más frecuencia en el noroeste de Argentina, llegando hasta la provincia de Chaco (Gardenal, 2011). Considerando la proporción en Argentina de los dos haplotipos presentes, el H presenta una frecuencia muy alta (90,74 %) respecto al haplotipo K (9,26%). Este predominio

de un haplotipo podría estar relacionado con un efecto cuello de botella provocado por el uso de insecticidas en su anterior erradicación (Carrozza *et al.*, 2016).

***Aedes (Stegomyia) albopictus* (Skuse)**

Aedes albopictus es un mosquito que puede estar presente en una variedad de hábitats, distribuidos en zonas rurales hasta urbanas, dejando en evidencia la habilidad de la especie para sobrevivir en gradientes variables de condiciones microambientales. Además de reproducirse en recipientes asociados al hombre, habita en recipientes naturales como bromélias, hueco de árbol y tocones de bambú (Hawley *et al.*, 1987; Monteiro Marques *et al.*, 2001). Las hembras presentan un hábito predominantemente diurno con un pico de actividad de “picadura” entre las 16 y 17 hs. Es una especie oportunista donde el humano es una fuente más de alimentación (Marques & De Castro Gomes, 1997).

Esta especie de mosquito es originaria del suroeste de Asia, ha sido descrito por primera vez en Calcuta, India por Skuse en 1984. Su distribución original abarca varias regiones biogeográficas: oriental, australasia y paleártica, por ello ha recibido el nombre de “tigre asiático” (Forattini, 2002). En su rama ancestral asiática tiene una distribución extendida que incluye poblaciones tropicales sin diapausa fotoperiódica y poblaciones templadas que presentan diapausa (Hawley 1988). La diapausa es una detención del desarrollo controlada hormonalmente que se desencadena mediante un estímulo antes del inicio de las condiciones ambientales desfavorables. Proporciona un mecanismo de adaptación para la coordinación temporal del crecimiento, desarrollo y la latencia en un entorno estacional (Armbruster, 2016).

Las poblaciones templadas de *Ae. albopictus* son resistentes al frío debido a la diapausa del huevo, dichas características se han encontrado en huevos en Norteamérica, constituyendo una prueba del origen templado de dicha invasión (Armbruster, 2016). En las poblaciones tropicales de *Ae. albopictus*, la diapausa está ausente, Lounibos (2003) sugirió de todas formas que durante la invasión, la diapausa evolucionó relativamente rápido.

Para al continente americano fue citada por primera vez en el condado de *Harris*, en *Texas* (EEUU) en el año 1985. El mosquito llegó vía marítima, en un embarque de neumáticos usados provenientes de Asia (Martínez Muñoz, 1995).

En América del Sur, 20 años después de su detección en Brasil ya se encontraba en 24 de sus 27 estados (Pancetti *et al.*, 2015).

Su distribución mundial actual, realizada gracias a 22.137 registros, se muestra en la figura 2.

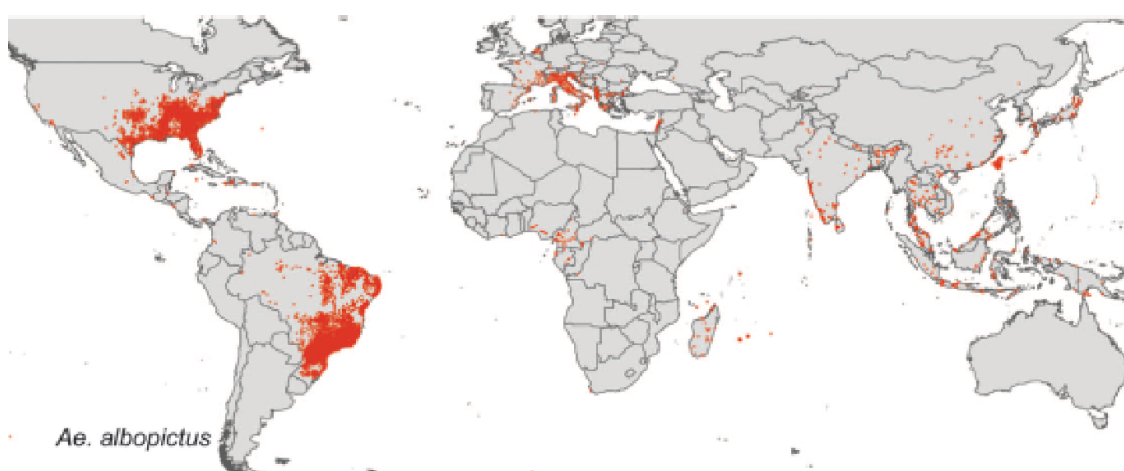


Figura 2. Distribución mundial de *Aedes albopictus* tomado de Kraemer *et al.* (2015)

Distribución en Argentina

Fue detectada por primera vez en Argentina en 1998 (Rossi *et al.*, 1999). A diferencia de otros países del continente, donde se ha dispersado ampliamente y de manera rápida, en nuestro país y hasta la actualidad su distribución se encuentra restringida a la provincia de Misiones. Se lo ha encontrado en las siguientes localidades: San Antonio (Rossi *et al.*, 1999); Eldorado (Schweigmann *et al.*, 2004); Puerto Iguazú y Comandante Andresito (Rossi *et al.*, 2006) y Colonia Aurora (Lizuain *et al.*, 2016). Las proporciones encontradas con respecto a *Ae. aegypti* son de 1/10 hasta 1/4 (Stein *et al.*, 2018).

Poblaciones simpátricas: Interacciones entre *Aedes aegypti* (L.) y *Ae. albopictus* (Skuse) (Diptera: Culicidae)

Las interacciones de las especies invasoras varían en el espacio y el tiempo y dependen de las condiciones locales y las especies que interactúan (Juliano & Lounibos, 2005).

Los estados inmaduros de *Aedes aegypti* y *Ae. albopictus* comúnmente se encuentran en el mismo contenedor artificial de áreas urbanas, suburbanas y rurales, constituyendo poblaciones simpátricas en regiones tropicales y sub tropicales (Braks *et al.*, 2003; Passos *et al.*, 2003, Rey *et al.*, 2006). Debido a este hábito asociativo, en diversas partes del mundo se han observado diferentes situaciones: la sustitución del mosquito nativo *Ae. albopictus* por *Ae. aegypti* en algunas áreas del núcleo urbano del sudeste de Asia; la disminución en la abundancia o el desplazamiento de *Ae. aegypti* por la reciente expansión de *Ae. albopictus*; y la existencia de regiones en las cuales ambas especies coexisten o inclusive viven como especies simpátricas (Rey & Lounibos, 2015).

La mayor parte de los estudios sobre la interacción de estas dos especies fueron realizados en Estados Unidos, por ejemplo en Florida, donde *Ae. aegypti* se encontraba distribuido por todo el estado antes de la llegada de *Ae. albopictus* en la década del 90, desde entonces ha disminuido en abundancia y distribución. Esta disminución en la abundancia se relacionó con el establecimiento de *Ae. albopictus* en áreas donde anteriormente su distribución se superponía (Kaplan *et al.*, 2010).

Para explicar este fenómeno de desplazamiento o competencia entre ambas especies surgieron varias hipótesis enmarcadas en principios ecológicos que postulan que dos especies no pueden ocupar el mismo nicho, lo que desencadena en la reducción de la población de una de las dos especies, debido a la competencia con la otra (Rey & Lounibos, 2015).

1. Segregación por hábitat

Las especies evitan la competencia directa explotando diferentes hábitats, los estudios de Braks *et al.* (2003) en Estados Unidos y Brasil demostraron la influencia del hábitat sobre la abundancia de ambas especies. *Aedes aegypti*

predomina en áreas urbanas, *Ae. albopictus* en áreas rurales y coexisten en áreas periurbanas.

2. Competencia por los recursos

Desde su introducción al continente americano se han observado distintas situaciones con respecto a la competencia interespecífica entre *Aedes aegypti* y *Ae. albopictus*. En América del Norte los experimentos en laboratorio realizados por Barrera (1996) demostraron que cuando existe hacinamiento o limitación en la fuente de alimentos en contenedores artificiales, *Ae. albopictus* tiene mejores oportunidades de supervivencia y causa reducciones significativas en la supervivencia de *Ae. aegypti*. Los experimentos a campo han arrojado resultados similares, sin embargo el resultado de la competencia interespecífica dependería del tipo de recurso alimenticio utilizado y de las condiciones ecológicas del hábitat. Por lo tanto la competencia por el recurso en el estado de larva parece ser suficiente para el reemplazo de *Ae. aegypti* por *Ae. albopictus* únicamente en hábitats marginales de *Ae. aegypti*, como áreas boscosas suburbanas de Florida (EE. UU.) (Juliano, 1998).

En Rio de Janeiro (Brasil) los experimentos a campo demostraron que *Ae. albopictus* es capaz de mantener un crecimiento poblacional positivo con respecto a *Ae. aegypti* a menor disponibilidad de recursos, sugiriendo que es un mejor competidor, de manera similar a las poblaciones de Norteamérica más allá del origen genético diferente de ambas poblaciones (Braks *et al.* , 2004; Heinisch *et al.*, 2019).

Con respecto a las condiciones del hábitat y la supervivencia de huevos, la desecación, las altas temperaturas y la baja humedad afectan de manera diferencial a ambas especies. En condiciones secas existe una mayor mortalidad para los huevos *Ae. albopictus* en comparación con *Ae. aegypti*. En condiciones de mayor humedad, existe un pequeño impacto para *Ae. aegypti* y un efecto negativo para *A. albopictus* (Juliano *et al.* 2002; Costanzo *et al.*, 2005).

3. Interferencia química

Esta hipótesis plantea que un aumento en la densidad de larvas de mosquitos resulta en la acumulación de productos de excreción tóxicos

(desechos nitrogenados), provocando algún efecto en la competencia (Bédhomme *et al.* 2005).

4. Competencia de apareamiento o satirización

Los efectos asimétricos de los apareamientos interespecíficos favorecen a *Aedes albopictus*, porque los machos de *Ae. albopictus* transfieren durante el apareamiento sustancias con efectos sobre las hembras de *Ae. aegypti* que le impide apareamientos posteriores. Sin embargo no fue observado este efecto de los machos de *Ae. aegypti* sobre las hembras de *Ae. albopictus* (Tripet *et al.*, 2011). Otros estudios en cambio indican que las hembras de *Ae. aegypti* en simpatria con *Ae. albopictus*, ya sea en condiciones naturales o experimentales, desarrollan rápidamente mecanismos de aislamiento reproductivo en apareamientos con machos de *Ae. albopictus* (Bargielowski *et al.*, 2013).

5. Eclosión retardada

La densidad larval influye en la eclosión de huevos, provocando una disminución en la tasa de eclosión en respuesta a los aumentos de la densidad larvaria. Este tipo de interacción tendría el potencial de provocar cambios rápidos en la composición de las especies larvales.

La eclosión en *Aedes* spp. se da luego que los huevos entran en contacto con el agua, y la superficie de los mismos es colonizada por microorganismos lo cual disminuye el oxígeno disuelto debido a la respiración microbiana y se desencadena la eclosión (Hawley *et al.*, 1987). A pesar de este estímulo para la eclosión, una parte de los huevos permanece en estado de latencia para eclosionar en las siguientes inundaciones, fenómeno conocido como eclosión en cuotas o retardada (Gillett *et al.*, 1977).

Las larvas impiden la eclosión de los huevos porque se alimentan de las bacterias que habitan su superficie, a medida que aumenta la densidad larvaria, se consumen más bacterias y disminuye la tasa de eclosión de huevos, este mecanismo estaría influyendo en la composición de las comunidades de *Aedes albopictus* y *Ae. aegypti* que habitan en los mismos recipientes. Esta hipótesis sugiere que las larvas de *Ae. albopictus* suprimen diferencialmente la eclosión de los huevos de *Ae. aegypti* (Edgerly *et al.*, 1993).

6. Patogenicidad diferencial por *Ascogregarina*

Esta hipótesis está centrada en la patogenicidad diferencial de las *Ascogregarina* (Craig, 1993) y plantea efectos asimétricos provocados por la infección. La infección podría causar descensos en la densidad de *Ae. aegypti*, el cual se infectaría con la especie parásito natural de *Ae. albopictus*, *A. taiwanensis*; causando efectos negativos en su supervivencia. En cambio la ascogregarina presente en *Ae. aegypti*, *A. culicis* no infectaría a *Ae. albopictus* (Munstermann & Wesson, 1990; Blackmore *et al.*, 1995; Juliano, 1998; Reyes-Villanueva *et al.*, 2003).

Mecanismos de coexistencia en Argentina

En el caso de las poblaciones simpátricas de *Aedes aegypti* y *Ae. albopictus* de Argentina, los trabajos previos realizados en la localidad de Eldorado correspondiente a Faraone (2016) plantean dos mecanismos que estarían actuando para permitir la coexistencia de ambas especies y no el reemplazo de una por otra. Uno de estos mecanismos es el efecto negativo sobre el sitio de ovoposición de una especie sobre la otra. El segundo es un patrón de eclosión diferente entre ambas especies, que les permitiría separarse en el tiempo y evitar la competencia directa entre ellas. *Aedes albopictus* alcanza los mayores porcentajes de eclosión antes que *Ae. aegypti*. Esto representaría una desventaja para *Ae. albopictus* ya que eclosiona en un ambiente pobre en nutrientes y con mayor riesgo de ocurrencia de efectos desafortunados, como por ejemplo la sequedad del criadero; esto indirectamente representaría una ventaja para *Ae. aegypti*.

BIBLIOGRAFÍA

Armbruster, P. A. (2016). Photoperiodic Diapause and the Establishment of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in North America. *Journal of Medical Entomology*, 53(5), 1013–1023. <https://doi.org/10.1093/jme/tjw037>

Bargielowski, I. E., Lounibos, L. P., & Carrasquilla, M. C. (2013). Evolution of resistance to satyrization through reproductive character displacement in populations of invasive dengue vectors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(8), 2888–2892. <https://doi.org/10.1073/pnas.1219599110>

Barrera, R. (1996). Competition and resistance to starvation in larvae of container-inhabiting *Aedes* mosquitoes. *Ecological Entomology*, 21, 11–127.

Bédhomme, S., Agnew, P., Sidobre, C., & Michalakis, Y. (2005). Pollution by conspecifics as a component of intraspecific competition among *Aedes aegypti* larvae. *Ecological Entomology*, 30(1), 1–7. <https://doi.org/10.1111/j.0307-6946.2005.00665.x>

Beserra, E. B., Castro Jr., F. P. de, Santos, J. W. dos, Santos, T. da S., & Fernandes, C. R. M. (2006). Biologia e exigências térmicas de *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) provenientes de quatro regiões bioclimáticas da Paraíba. *Neotropical Entomology*, 35(6), 853–860. <https://doi.org/10.1590/s1519-566x2006000600021>

Braks, M. A. H., Honório, N. A., Lounibos, L. P., Lourenço-De-Oliveira, R., & Juliano, S. A. (2004). Interspecific Competition between Two Invasive Species of Container Mosquitoes, *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae), in Brazil. *Annals of the Entomological Society of America*, 97(1), 130–139. [https://doi.org/10.1603/0013-8746\(2004\)097\[0130:ICBTIS\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1603/0013-8746(2004)097[0130:ICBTIS]2.0.CO;2).

Braks, M. A. H., Honório, N. A., Lourenço-De-Oliveira, R., Juliano, S. A., & Lounibos, L. P. (2003). Convergent Habitat Segregation of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in Southeastern Brazil and Florida. *Journal of Medical Entomology*, 40(6), 785–794. <https://doi.org/10.1603/0022-2585-40.6.785>

Calado, D. C., & Navarro-Silva, M. A. (2008). Influência da temperatura sobre a longevidade, fecundidade e atividade hematofágica de *Aedes* (*Stegomyia*)

albopictus Skuse, 1894 (Diptera, Culicidae) sob condições de laboratório. *Revista Brasileira de Entomologia*, 46(1), 93–98. <https://doi.org/10.1590/s0085-56262002000100011>.

Campos, R. E., & Macia, A. (1996). Observaciones biologicas de una poblacion natural de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) en la provincia de Buenos Aires, Argentina. *Rev. Soc. Ent. Arg.*, 55 (1-4), 67–72.

Costanzo, K. S., Kesavaraji, B., & Juliano, S. A. (2005). Mosquitoes : the Role of Noncompeting Life-History. *Ecology*, 86(12), 3289–3295.

Carrozza, y Rubio-Palis, F. H. (2016). Genetic structure of Latin American *Aedes aegypti* Estructura genética de *Aedes aegypti* latinoamericano. *Boletín de Malariología y Salud Ambiental*, LVI(I), 53–62.

Couret, J., Dotson, E., & Benedict, M. Q. (2014). Temperature, larval diet, and density effects on development rate and survival of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *PLoS ONE*, 9(2). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0087468>.

Díaz-Nieto, L. M., Maciá, A., Perotti, M. A., & Berón, C. M. (2013). Geographical Limits of the Southeastern Distribution of *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae) in Argentina. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 7(1), e1963. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001963>

Dueñas, J. C. R., Llinás, G. A., Panzetta-Dutari, G. M., & Gardenal, C. N. (2009). Two Different Routes of Colonization of *Aedes aegypti* in Argentina From Neighboring Countries. *Journal of Medical Entomology*, 46(6), 1344–1354. <https://doi.org/10.1603/033.046.0613>

Edgerly, J. S, Willey, M. S., & Livdahl T.P. (1993). The community ecology of *Aedes* egg hatching: implications for a mosquito invasion. *Ecological Entomology*, 18, 123–128.

Estallo, E. L., Ludueña-Almeida, F. F., Introini, M. V., Zaidenberg, M., & Almirón, W. R. (2015). Weather variability associated with *Aedes* (*Stegomyia*) *aegypti* (Dengue Vector) oviposition dynamics in Northwestern Argentina. *PLoS ONE*, 10(5), 1–11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0127820>

Faraone J. (2016). Patrones de eclosión y ovoposición de *Aedes aegypti* (Linnaeus) y *Aedes albopictus* (Skuse) (Diptera: Culicidae) en la ciudad de Eldorado, Misiones (tesina de grado). Universidad Nacional del Nordeste, Corrientes, Argentina.

Gardenal, C. N. (2011). Desde la genética de poblaciones, aportes al conocimiento de la historia natural de algunas zoonosis. *BAG - Journal of Basic and Applied Genetics*, 22(1).

Gillett, F. D., Roman, E. A., & Phillips, V. (1977). Erratic hatching in *Aedes* eggs: a new interpretation. *Proceedings of the Royal Society of London - Biological Sciences*, 196(1123), 223–232. <https://doi.org/10.1098/rspb.1977.0038>

Gould, E., Pettersson, J., Higgs, S., Charrel, R., & de Lamballerie, X. (2017). Emerging arboviruses: Why today? *One Health*, 4(July), 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.onehlt.2017.06.001>

Grech, M. G., Ludueña-Almeida, F., & Almirón, W. R. (2010). Bionomics of *Aedes aegypti* subpopulations (Diptera: Culicidae) from Argentina. *Journal of Vector Ecology*, 35(2), 277–285. <https://doi.org/10.1111/j.1948-7134.2010.00083.x>

Harrington, L. C., Edman, J. D., & Scott, T. W. (2001). Why do female *Aedes aegypti* (Diptera: CulicidaHarrington, L. C., Edman, J. D., & Scott, T. W. (2001). Why do female *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) feed preferentially and frequently on human blood? *Journal of Medical Entomology*, 38(3), 411–422. <https://doi.org/10.1603/0022-2585-38.3.411>

Hawley, W. A., Reiter, P., Copeland, R., Pumpuni, C., & Craig, G. (1987). *Aedes albopictus* in North America: probable introduction in used tires from northern Asia. *Science*, 236(4805), 1114–1116. <https://doi.org/10.1126/science.3576225>

Heinisch, M. R. S., Diaz-Quijano, F. A., Chiaravalloti-Neto, F., Menezes Pancetti, F. G., Rocha Coelho, R., dos Santos Andrade, P., Lima-Camara, T. N. (2019a). Seasonal and spatial distribution of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in a municipal urban park in São Paulo, SP, Brazil. *Acta Tropica*. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2018.09.011>

Juliano, S. A., O'Meara, G. F., Morrill, J. R., & Cutwa, M. M. (2002). Desiccation and thermal tolerance of eggs and the coexistence of competing mosquitoes. *Oecologia*, 130(3), 458–469. <https://doi.org/10.1007/s004420100811>

Juliano SA; Lounibos LP. (2005). Ecology of invasive mosquitoes: effects on resident and on human health. *Ecol. Lett.*, 8(5), 558–574. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2013.06.005.Re-Thinking>

Juliano. (1998). Species Introduction and Replacement among Mosquitoes: Interspecific Resource Competition or Apparent Competition? Author. *Ecology*, 79(1), 255–268

Kaplan, L., Kendell, D., Robertson, D., Livdahl, T., & Khatchikian, C. (2010). *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in Bermuda: Extinction, invasion, invasion and extinction. *Biological Invasions*, 12(9), 3277–3288. <https://doi.org/10.1007/s10530-010-9721-z>

Kingsolver, J. G., & Huey, R. B. (2008). Size, temperature, and fitness: three rules. *Evolutionary Ecology Research*, 10(2), 251–268. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2231624>

Kraemer, M. U. G., Sinka, M. E., Duda, K. A., Mylne, A., Shearer, F. M., Brady, O. J., Hay, S. I. (2015). The global compendium of *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus* occurrence. *Scientific Data*, 2, 1–8. <https://doi.org/10.1038/sdata.2015.35>

Lizuain, A. A., Leporace, M., Santini, M. S. & Schweigmann, N. 2006. Presencia y abundancia relativa de *Aedes albopictus* y *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) según dimensiones de recipiente de cría en dos municipios de la provincia de Misiones, Argentina. x Jornadas Regionales Sobre Mosquitos.15 y 16 de Septiembre del 2016, Mar del Plata, Argentina. 53.

Lopes, J., Castilho Martins, E. A., De Oliveira, O., De Oliveira, V., De Oliveira Neto, B. P., & De Oliveira, J. E. (2004). Dispersión of *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) and *Aedes albopictus* (Skuse, 1894) in the Rural Zone of North Paraná State. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 47(5), 739–746.

Lounibos, L. P. (2002). Invasions by Insect Vectors of Human Disease. *Annu. Rev. Entomol*, 47(18), 233–266.

Marques, G. R. A. M., & De Castro Gomes, A. (1997). Comportamento antropofílico de *Aedes albopictus* (Skuse) (Diptera: Culicidae) na região do Vale do Paraíba, Sudeste do Brasil. *Revista de Saude Publica*, 31(2), 125–130.

Monteiro Marques, G. R., La Corte dos Santos, R., & Forattini, O. P. (2001). *Aedes albopictus* in bromelias of anthropic environment in São Paulo State, Brazil. *Revista de Saúde Pública*, 35(3), 243–248.

Munstermann, L. E., & Wesson, D. M. (1990). First record of *Ascogregarina taiwanensis* (Apicomplexa: Lecudinidae) in North American *Aedes albopictus*. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 6(2), 235–243. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2370530>

Muttis, E., Balsalobre, A., Mangudo, C., Ciota, A. T., Kramer, L. D., Micieli, M. V., & Chuchuy, A. (2018). Factors Related to *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) Populations and Temperature Determine Differences on Life-History Traits With Regional Implications in Disease Transmission. *Journal of Medical Entomology*, (May), 1–8. <https://doi.org/10.1093/jme/tjy057>

Pancetti, F. G. M., Honório, N. A., Urbinatti, P. R., & Lima-Camara, T. N. (2015). Twenty-eight years of *Aedes albopictus* in Brazil: A rationale to maintain active entomological and epidemiological surveillance. *Revista Da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 48(1), 87–89. <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0155-2014>

Passos, R. A., Marques, G. R. A. M., Voltolini, J. C., & Condino, M. L. F. (2003). Dominance of *Aedes aegypti* over *Aedes albopictus* in the southeastern coast of Brazil. *Revista de Saude Publica*, 37(6), 729–734.

Petersen, J. L. 1977. Behavior differences in two subspecies of *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) in East Africa. Ph.D. dissertation, University of Notre Dame, Notre Dame, IN.

Reinhold, J. M., Lazzari, C. R., & Lahondère, C. (2018). Effects of the environmental temperature on *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* mosquitoes: A review. *Insects*, 9(4). <https://doi.org/10.3390/insects9040158>

Rey, J. R., Nishimura, N., Wagner, B., Braks, M. A. H., O'Connell, S. M. ., & Lounibos, L. P. (2006). Habitat Segregation of Mosquito Arbovirus Vectors in

South Florida. *J. Med. Entomol.*, 43(6), 1143–1141.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0178059>

Reyes-Villanueva, F., Becnel, J. J., & Butler, J. F. (2003). Susceptibility of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* larvae to *Ascogregarina culicis* and *Ascogregarina taiwanensis* (Apicomplexa: Lecudinidae) from Florida. *Journal of Invertebrate Pathology*, 84(1), 47–53. [https://doi.org/10.1016/S0022-2011\(03\)00119-8](https://doi.org/10.1016/S0022-2011(03)00119-8)

Rossi, G. C., Pascual, N. T., & Krsticevic, F. J. (1999). First record of *Aedes albopictus* (Skuse) from Argentina. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 15(3), 422. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10480134>

Rossi Gustavo, C., Lestani, E. A., & Oria, J. (2006). Nuevos registros y distribución de mosquitos de la Argentina (Diptera: Culicidae). *Rev. Soc. Entomol. Argent.* 65(3–4), 51–56.

Rueda, L. M., Patel, K. J., Axtell, R. C., & Stinner, R. E. (1990). Temperature-dependent development and survival rates of *Culex quinquefasciatus* and *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Journal of Medical Entomology*, 27(5), 892–898. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2231624>

Schweigmann, N., Vezzani, D., Orellano, P., Kuruc, J., & Boffi, R. (2004). *Aedes albopictus* in an area of Misiones, Argentina. *Revista de Saude Publica*, 38(1), 136–138. <https://doi.org/10.1590/S0034-89102004000100020>

Stein, M., Oria, G. I., Almirón WR, & Willener, J. A. (2005). Fluctuación estacional de *Aedes aegypti* en Chaco, Argentina. *Rev Saude Publica*, 39(4), 559–564.

Tripet, F., Lounibos, L. P., Robbins, D., Moran, J., Nishimura, N., & Blosser, E. M. (2011). Competitive reduction by satyrization? Evidence for interspecific mating in nature and asymmetric reproductive competition between invasive mosquito vectors. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 85(2), 265–270. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2011.10-0677>

Vezzani, D., & Carbajo, A. E. (2008). *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus*, and dengue in Argentina: Current knowledge and future directions. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 103(1), 66–74. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762008005000003>

Vezzani, D., Rubio, A., Velázquez, S. M., Schweigmann, N., & Wiegand, T. (2005). Detailed assessment of microhabitat suitability for *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) in Buenos Aires, Argentina. *Acta Tropica*, 95(2), 123–131. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2005.03.010>

Vezzani, D., Velázquez, S. M., & Schweigmann, N. (2004). Seasonal pattern of abundance of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) in Buenos Aires City, Argentina. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 99(4), 351–356. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762004000400002>

Waldock, J., Chandra, N. L., Lelieveld, J., Proestos, Y., Michael, E., Christophides, G., & Parham, P. E. (2013). The role of environmental variables on *Aedes albopictus* biology and chikungunya epidemiology. *Pathogens and Global Health*, 107(5), 224–241. <https://doi.org/10.1179/2047773213y.0000000100>

CAPÍTULO 1

Distribución espacio-temporal de *Aedes aegypti*
y *Ae. albopictus* en Eldorado, Misiones

INTRODUCCIÓN

Los estudios de patrones temporales y espaciales a escala regional, de mosquitos vectores de patógenos que afectan a la salud humana, son importantes desde el punto de vista epidemiológico (Vezzani & Carbajo, 2008; Waldock *et al.*, 2013).

Aedes aegypti Linnaeus se encuentra ampliamente distribuido en áreas urbanas templadas, tropicales y sub tropicales con una preferencia a los recipientes artificiales para la oviposición (Lopes *et al.*, 2004; Vezzani & Carbajo, 2008). *Aedes albopictus* Skuse ha extendido su distribución por el mundo con éxito en los últimos 30 años, gracias a su plasticidad fisiológica y ecológica. La fisiológica dada, al igual que en *Ae. aegypti*, principalmente por la capacidad de sobrevivir en condiciones tropicales y templadas gracias a la puesta de huevos resistentes al frío y la desecación; y la ecológica relacionada con la capacidad de reproducirse en diversos hábitats naturales (huecos de árboles, bromelias, tocones de tacuara) hasta una amplia variedad de recipientes provistos por el hombre (Vezzani & Carbajo, 2008; Waldock *et al.*, 2013).

Influencia del ambiente y las variables climáticas en la biología de *Aedes* spp.

La tasa de desarrollo y la supervivencia de los organismos, incluidos los mosquitos vectores, varían en respuesta a diversos factores bióticos y abióticos del medio en el que se desarrollan (Beserra *et al.*, 2006; Serpa *et al.*, 2013). La ampliación a nivel global en la distribución de *Ae. aegypti* y *Ae. albopictus* en los últimos 30 años, estaría relacionado con la modificación de las variables ambientales, cuyos efectos provocan un cambio climático (Reinhold *et al.*, 2018). Entre las variables ambientales la lluvia, la temperatura y la humedad relativa son factores determinantes de la presencia y frecuencia de ambas especies (Azil *et al.*, 2010; Nance *et al.*, 2018).

Temperatura

La temperatura es un factor abiótico que influye directa o indirectamente en la biología de los insectos, afectando su fisiología, ecología, desarrollo, desplazamiento y supervivencia (Reinhold *et al.*, 2018). Particularmente en los

insectos vectores ejerce un importante efecto en la dinámica poblacional. Las tasas de desarrollo de *Ae. aegypti* y *Ae. albopictus* es función de la temperatura ambiental, sin embargo el acervo genético de las poblaciones desempeña un rol importante en el comportamiento de las mismas. Esto ha sido demostrado en Argentina para *Ae. aegypti*, en el cual se observó un comportamiento diferencial en poblaciones provenientes de diferentes lugares geográficos criadas bajo las mismas condiciones de laboratorio. Esta evidencia de adaptación a las condiciones ambientales locales está respaldada por el hecho que en nuestro país existen altos niveles de polimorfismo genético producto de los diferentes orígenes de las poblaciones (Dueñas *et al.*, 2009; Grech *et al.*, 2010; Llinás & Gardenal, 2011; Muttis *et al.*, 2018).

La temperatura, junto a la humedad relativa son factores esenciales en la supervivencia del adulto de *Aedes* spp.; en cuanto a los estadios larvales adquiere importancia la temperatura del agua (Beserra *et al.*, 2006; Waldoock *et al.*, 2013). Los valores más altos se relacionan con un desarrollo del ciclo más rápido (Rueda *et al.*, 1990; Kingsolver & Huey, 2008; Couret *et al.*, 2014). Para poblaciones de *Ae. aegypti* de la región noreste de Brasil la temperatura favorable para el desarrollo del ciclo de vida es entre 21°C y 29°C, y para la longevidad y fecundidad entre 22°C y 30°C. Con temperaturas por debajo de 17°C la eclosión de huevos no ocurre (Beserra *et al.*, 2006). Para la fase larvaria, la mayor supervivencia fue observada a temperaturas de 21°C. Para poblaciones del norte de Argentina, las condiciones óptimas de temperatura del agua para un desarrollo larval de 5,8 días y de pupa 2,5 días es de 25,6 °C (Tejerina *et al.*, 2009).

En cuanto a la supervivencia del adulto de *Ae. albopictus*, se observa una disminución de la longevidad por debajo de 15°C y por encima de 30°C (Calado & Navarro-Silva, 2008). Con respecto a la resistencia al frío de los huevos, experimentos realizados con huevos provenientes de Asia y EE UU mostraron que resisten por 24 hs a -10° C. Las larvas y pupas evidencian una supervivencia óptima entre 25°C y 30°C, y una alta mortalidad por debajo de 15°C y por encima de 36°C (Waldoock *et al.*, 2013).

Precipitación

La precipitación es una de las variables ambientales más complejas que afecta a las poblaciones de mosquitos. Por un lado influye sobre la creación de nuevos sitios de reproducción, pero además debido a la escasa o ninguna resistencia de los estados larvales y de pupa a la desecación, cuando es escasa y no alcanza para mantener los volúmenes de agua de los sitios de cría, provoca disminuciones en la población. Otro factor negativo asociado a las precipitaciones abundantes es el lavado de los sitios de cría que afectaría los estados inmaduros (Waldock *et al.*, 2013).

Diferentes investigaciones han demostrado que la temperatura y la precipitación afectan la dinámica poblacional de mosquitos (Alto & Juliano, 2001; Vezzani *et al.*, 2004; Ponce *et al.*, 2004; Stein *et al.*, 2005; Almeida Costa *et al.*, 2006).

Humedad relativa

La humedad relativa tiene un impacto en las etapas de huevo y adulto del ciclo de vida de los culícidos. Para *Ae. albopictus* las tasas de eclosión de huevos son mayores a valores altos de humedad relativa (HR). En cuanto a la supervivencia del adulto, con valores de humedad igual o inferior al 50 % se observó una disminución de la longevidad, donde los individuos sobreviven de 1 a 3 días (Calado & Navarro-Silva, 2008).

En *Ae. aegypti* los porcentajes de humedad altos (80%) junto a temperaturas de 25°C, aumenta la tasa de ovoposición, mientras que a temperaturas de 35°C y 60 % de humedad se produce un rápido descenso en la puesta de huevos (Canyon & Müller, 1999; Almeida Costa *et al.*, 2006). La fecundidad y supervivencia del adulto también es afectada por la humedad junto a la temperatura. Con valores de humedad de entre un 60 y 90% las diferencias en la supervivencia del adulto son muy pequeñas, con valores más bajos o superiores al 90% se produce una disminución en la longevidad (Mogi *et al.*, 1996; Reiskind *et al.*, 2009; Waldock *et al.*, 2013).

Distribución temporal de *Aedes aegypti* y *Ae. albopictus* en Argentina

Los datos de distribución temporal en Argentina provienen principalmente de estudios de oviposición realizados en diferentes regiones geográficas que evidencian distintos patrones estacionales. En la región templada existe un patrón de oviposición discontinuo más relacionado a la temperatura ambiente que a las precipitaciones, registrándose ausencia de ovipostura en los meses más fríos (Campos & Maciá, 1996; Carbajo *et al.*, 2004; Vezzani *et al.*, 2004). En la región subtropical existen patrones diferentes para la región noreste (NEA) y noroeste (NOA) debido a que la dinámica de oviposición de *Ae. aegypti* está fuertemente influenciada por las variables meteorológicas, especialmente las temperaturas mínimas (Estallo *et al.*, 2015). Existen trabajos que evidencian un patrón ininterrumpido de actividad de *Ae. aegypti* todo el año en Corrientes y Misiones (NEA) y Salta (NOA) (Borda *et al.* 1999; Micieli & Campos, 2003; Aponte, 2017; Stein *et al.*, 2018). En cambio Estallo *et al.*, (2015) en Orán, Salta y Stein *et al.* (2005) en Resistencia, Chaco encontraron un patrón interrumpido de oviposición, sin actividad en la época invernal.

Los escasos estudios sobre *Ae. albopictus* en Misiones registran su presencia durante todo el año con proporciones entre 1/10 hasta 4/10 respecto de *Ae. aegypti* (Lizuain *et al.*, 2016; Stein, 2018).

Distribución espacial de *Aedes aegypti* y *Ae. albopictus* en Argentina

La distribución actual de *Ae. aegypti* en Argentina lo sitúa más hacia el sur y al oeste que en el siglo pasado durante su erradicación (Díaz-Nieto *et al.*, 2013). Rossi (2015) cita a la especie en todas las regiones de Argentina, incluido Cuyo y la provincia de Neuquén. Entre las hipótesis para explicar este desplazamiento se encuentran la variabilidad genética de las subpoblaciones de Argentina (Gardenal, 2011) y los desplazamientos de isotermas hacia el sur del país (Burgos *et al.*, 1994). En el caso de *Ae. albopictus* su distribución está restringida a cinco localidades de la provincia de Misiones, donde su presencia y abundancia se ha relacionado con áreas periurbanas de abundante vegetación (Espinosa *et al.*, 2007).

La escasez de estudios a escala regional sobre los patrones temporales realizados de manera ininterrumpida con *Ae. aegypti* en el noreste de Argentina, sumado a los interrogantes en cuanto a la bionomía de *Ae. albopictus* en el país, nos llevaron a plantear los siguientes objetivos:

- Analizar la distribución espacial y temporal de poblaciones simpátricas de *Ae. aegypti* y *Ae. albopictus* en la localidad de Eldorado, Misiones.
- Determinar la asociación entre las variables ambientales (precipitación, humedad relativa y temperatura media mensual) con la abundancia de *Ae. aegypti* y *Ae. albopictus* en la localidad de Eldorado, Misiones

MATERIALES Y MÉTODOS

Descripción del área de estudio:

La ciudad de Eldorado (26°24'00"S 54°38'00"O) se encuentra ubicada a 212 m sobre el nivel del mar, al noroeste de la provincia de Misiones, Noreste de Argentina (Fig. 1). Pertenece al departamento homónimo, es la tercera ciudad más importante de la provincia, con una población de 100 mil habitantes.

La ciudad se desarrolla a ambos lados de la ruta Nacional N°12, organizada en 95 barrios. Las principales actividades económicas de la región son la explotación forestal (aserraderos, industria celulósica papelera) y la agricultura, orientada a la producción de cultivos industriales (yerba mate, té, tabaco y cítricos (<https://www.eldorado.gob.ar>)).

Fitogeográficamente corresponde a la provincia Paranaense, Bosque Atlántico Interior. Se caracteriza por presentar tres estratos arbóreos, con lianas, epífitas y hemiepífitas; y un sotobosque de helechos y fanerófitas herbáceas y arbustivas, incluidas bambúseas (Oyarzabal *et al.*, 2018). El clima es cálido y húmedo, subtropical sin una estación seca marcada, con una importante amplitud térmica y pluviométrica, lo que denota su carácter "continental" y convierte a esta región en una de las más húmedas del país. La temperatura media anual es de 22°C, con una temperatura máxima de 38,5°C y mínima de -5,4°C. El período sin heladas es de 315 días. La precipitación media anual es de 2017 mm y la temporada más lluviosa es en otoño (563 mm) (Eibl *et al.*, 1999; Manso Hernández *et al.*, 2010).



Figura.1. Mapa de localización en Argentina de la provincia de Misiones. Sitio de colecta: ciudad de Eldorado.

Recolección de culícidos

Los muestreos mensuales para captura de estados inmaduros (larvas y/o pupas) se realizaron desde mayo de 2016 a abril de 2018. Las muestras se tomaron de hábitats artificiales (considerados aquellos contenedores provistos por el hombre propicios para el desarrollo de estados inmaduros de mosquitos) y hábitats naturales como: bromelias, tacuaras y huecos de árbol. Se seleccionaron 4 tipos de sitios o paisajes, descritos a continuación, buscando abarcar los ambientes más favorables para la cría de culícidos, en base a muestreos previos realizados por el grupo de trabajo. En la fig. 2 se observa la distribución de los sitios de muestreo.

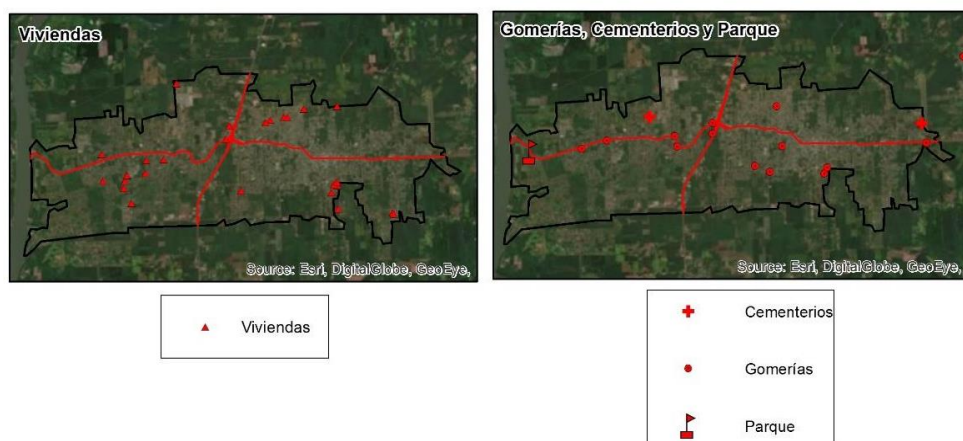
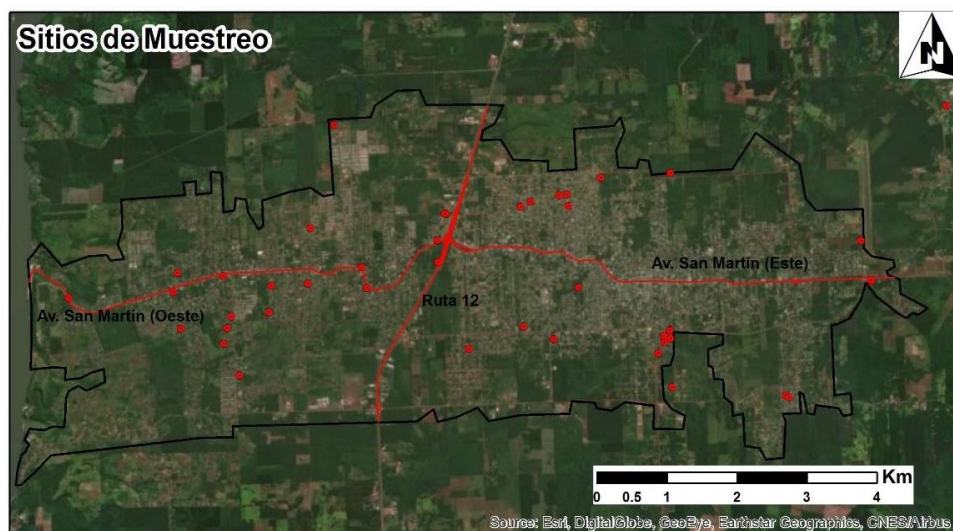


Figura 2. Mapa de la ciudad de Eldorado, Misiones con los puntos de muestreo. Los datos fueron tomados con Garmin, y el mapa se realizó con datum WGS 84 (World Geodetic System 1984).

Viviendas familiares: las viviendas están ubicadas en terrenos amplios y presentan abundante vegetación, transformándolas en un sitio de potencial acumulación de recipientes con agua. Las visitas a los diferentes barrios de la ciudad se realizaron junto al personal de control de vectores de la municipalidad de Eldorado, quienes realizaban además el trabajo de control focal, que consistía en la entrega de folletos explicativos al residente de la vivienda, detección de los criaderos y servicio de recolección de aquellos que no podían ser eliminados fácilmente, por ejemplo chatarras. Dentro del domicilio se realizó la búsqueda de potenciales recipientes de cría en los alrededores de la vivienda (Fig. 3).



Figura. 3. Recolección de culícidos en patios de viviendas familiares de Eldorado, Misiones.

Cementerios: las muestras fueron colectadas en todos los cementerios de la ciudad, “Católico histórico Picada 18” y “San Juan” ($26^{\circ}24'14.0''S$, $54^{\circ}34'33.3''W$) ubicados en el km 12 de la avenida San Martín, linderos a una zona residencial de la ciudad, rodeados de abundante vegetación y con plantaciones de pino cercanas; “La Piedad”, “Cementerio Danés y “Cementerio Luterano” ubicados lindantes en el km 4 de la avenida San Martín ($26^{\circ}402'709''S$ y $54^{\circ}653'.684''O$). En los alrededores de éstos últimos se encuentran barrios de viviendas familiares y asentamientos precarios. En cada uno de los predios se recorrieron nichos y tumbas en el suelo, de estas últimas se extrajo la mayor cantidad de muestras (Fig. 4).



Figura. 4. Recolección de culícidos en cementerios de Eldorado, Misiones.

Gomerías: existen en la ciudad una gran cantidad de gomerías distribuidas por el casco urbano y alrededores. Se han visitado durante el periodo de muestreo alrededor de 17 diferentes, se buscó visitar mensualmente las mismas, hecho que resultó muy difícil por ser una actividad muy fluctuante en la ciudad (Fig. 5).



Figura. 5. Hábitats de culícidos en gomerías de la ciudad de Eldorado, Misiones.

Parque Schwelm: es un parque urbano municipal de aprox. 8 hectáreas que se encuentra en el extremo oeste de la ciudad en cercanías de la costa del río Paraná ($26^{\circ}24'36.4''S$ y $54^{\circ}41'20.9'' O$). Posee un área de camping y parqueizado con especies exóticas y bromélias, además se encuentra un museo municipal con la casa del fundador de la ciudad. En la zona más cercana al río presenta un tacuaral, rodeado de bosque secundario (Fig. 6).



Figura. 6. Parque Municipal Schwelm y sus diferentes áreas, Eldorado, Misiones.

El agua de los criaderos fue colectada directamente a una bandeja blanca, en los casos en que no fue posible tomar todo el volumen de agua se utilizó un cucharón de 300 ml de capacidad, efectuándose siempre que fuera posible 10 colectas por criadero. Para transferir las larvas desde la bandeja blanca a frascos apropiados para su traslado al laboratorio se utilizaron pipetas plásticas. Los frascos fueron tapados y rotulados con los correspondientes datos de colección (tipo de criadero, sitio y fecha). En los criaderos naturales se utilizó un frasco aspirador, que consiste en un frasco de vidrio con tapón de goma perforado con dos orificios, por donde se colocaron mangueras plásticas flexibles utilizadas para la aspiración, y a modo de sifón, toda el agua es colectada.

Se registraron las variables de interés de cada uno de los hábitats larvales, como ser pH; temperatura; volumen de agua; color del agua; turbidez; cobertura del recipiente; presencia de materia orgánica; tipo de recipiente; material de construcción; ubicación respecto a la luz solar considerando sombra parcial: cuando el criadero estaba parcialmente expuesto al sol, sombra profunda: los rayos solares no ingresaban al criadero y pleno sol: durante la mayor parte del día existía una exposición directa a la luz solar (Tabla 1). Todos estos registros se consignaron en planillas confeccionadas para tal fin, donde además se georeferenciaron los sitios positivos para especies de Culicidae. El número de

muestras mensual fue de N=60, distribuidos de la siguiente manera: 20 hábitats naturales, 20 hábitats artificiales de cementerio, 10 de gomerías y 10 de viviendas. Las larvas y/o pupas fueron trasladadas al laboratorio del Instituto de Medicina Regional para su cría, conservación y determinación (Fig. 7).

Los hábitats larvales fueron clasificados en tres categorías: presencia de *Ae. aegypti* sin *Ae. albopictus* (AE) presencia de *Ae. albopictus* sin *Ae. aegypti* (AA) y presencia de ambas especies (AAE). No se ha considerado la presencia de otros culícidos en la clasificación de hábitats.

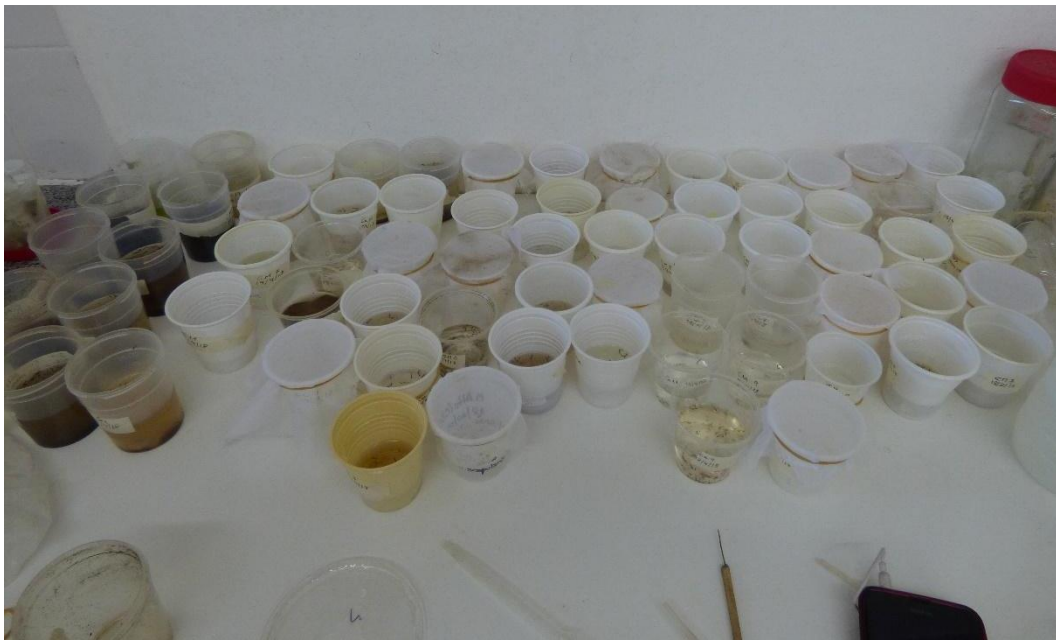


Figura 7. Cría de culícidos en el Instituto de Medicina Regional, Resistencia, Chaco.

Tabla 1. Variables medidas en los diferentes hábitats de Culicidae de la ciudad de Eldorado, Misiones

Variables del hábitat
sitio (vivienda familiar, gomería, cementerio, parque)
tipo de recipiente (chatarra, lona, caucho /neumático, recipiente de cemento, recipiente de cerámica, recipiente de metal, recipiente de plástico, recipiente natural, recipiente de vidrio, tanque de agua, otros)
materia orgánica en descomposición (presencia, ausencia)
tamaño del hábitat larval (pequeño, mediano, grande)
localización del hábitat en relación al sol (sombra parcial, sombra profunda, pleno sol)
temperatura del agua (registrada con termómetro digital)
pH del agua (registrado con dispositivo digital)
color del agua (estimado visualmente, transparente, ocre, marrón, negro, verde)
turbidez del agua (estimada visualmente como baja, media, alta)

Identificación de individuos

Para la determinación de las especies de Culicidae halladas se utilizaron claves dicotómicas (Darsie 1985; Consoli y de Oliveira 1994). La observación de las larvas se realizó bajo la luz de un microscopio estereoscópico (Zeiss Stemi 2000-C) (1X).

Análisis de datos

Los análisis fueron realizados con el software estadístico InfoStat /E versión 2018 (Di Rienzo et al., 2018). Para la comparación de las abundancias mensuales de *Ae. aegypti* y *Ae. albopictus* se utilizó el test de Kruskal-Wallis para análisis de la varianza no paramétrico, luego de probar la normalidad de los datos con Shapiro-Wilks. Además se realizó una prueba de comparaciones de pares.

Para establecer relaciones entre la abundancia de larvas, temperatura media, humedad relativa y la precipitación acumulada se realizó un análisis de correlación lineal simple, utilizando el coeficiente de correlación de rangos de Spearman. Las correlaciones se realizaron sin retraso y con 4 y 8 semanas de retraso.

La información de las variables meteorológicas fue proporcionada por el Servicio Meteorológico Nacional, de la estación más cercana ubicada en la ciudad de Puerto Iguazú (25° 40' 0" S, 54° 30' 0" W), ubicada a 100 km de la localidad de estudio. Se calcularon promedios mensuales obteniendo las variables: temperatura mensual mínima (Tmin), temperatura media (Tmed) y máxima (Tmax); humedad relativa mínima (HRmin) y máxima (HRmax). En el caso de la variable precipitación (Prec.) se utilizaron los valores acumulados. Teniendo en cuenta las características biológicas de las especies estudiadas se correlacionó la variable respuesta con las variables climáticas además de sin retraso, con un tiempo de retardo de 4 y 8 semanas, es decir, un lapso que transcurre desde que se registra un cambio en las condiciones meteorológicas, y que se vea reflejado en el número de inmaduros encontrados (Dominguez *et al.*, 2000).

RESULTADOS

Distribución espacial de *Aedes aegypti* y *Ae. albopictus* en la ciudad de Eldorado, Misiones

Como resultado de los muestreos realizados de mayo de 2016 a abril de 2018 en la ciudad de Eldorado, se recolectaron 20.057 larvas y/ pupas de *Ae. aegypti*, 3150 de *Ae. albopictus* y 4570 de otros culícidos (*Aedes* spp., *Culex* spp., *Limatus* spp., *Sabethes* spp., *Toxorhynchites* spp., y *Wyeomyia* spp.).

Se encontró diferencias significativas en las abundancias de *Ae. aegypti* y *Ae. albopictus* entre los cuatro sitios de muestreo ($H=104.59$, $p < 0.0001$ y $H=37.14$, $P < 0.001$). En el caso de *Ae. aegypti* la mayor abundancia se halló en las viviendas familiares mientras que en el parque se registró la menor abundancia de larvas y/o pupas (Tabla 2).

Tabla 2. Abundancia de *Aedes aegypti* en los diferentes sitios de muestreo en la localidad de Eldorado, Misiones.

Sitio	Abundancia total	N° recip. positivos	Media inmaduros	D.E.	*
Vivienda familiar	8744	215	40,67	51,44	A
Gomería	5081	195	26,09	38,64	B
Cementerio	6183	345	17,92	28,15	C
Parque	49	36	1,36	2,46	D

*: Test de prueba de comparaciones de a pares: medias con una letra común no presentan diferencias significativas ($p > 0,05$); Desvío estándar (D.E.)

Para *Ae. albopictus*, el sitio gomería se diferenció significativamente del resto de los sitios, al presentar el menor número medio de larvas. El resto de los sitios no presentaron diferencias significativas entre sí (Tabla 3).

Tabla 3. Abundancia de *Aedes albopictus* en los diferentes sitios de muestreo en la localidad de Eldorado, Misiones.

Sitio	Abundancia total	N° recip. positivos	Media inmaduros	D.E.	*
Vivienda familiar	1348	215	6,25	15,16	B
Gomería	182	196	0,93	2,67	A
Cementerio	1528	345	4,43	11,56	B
Parque	92	37	2,59	3,91	B

*: Test de prueba de comparaciones de a pares: medias con una letra común no presentan diferencias significativas ($p > 0,05$); Desvío estándar (D.E.)

Con respecto a las categorías de criaderos y su distribución por sitios se hallaron diferencias significativas (Chi cuadrado de Pearson 207.39, $p < 0.0001$). El cementerio fue el sitio donde se encontró la mayor abundancia de recipientes de cría con *Ae. aegypti* sin *Ae. albopictus* (AE), y con *Ae. aegypti* y *Ae. albopictus* criando en el mismo hábitat (AAE). Mientras que la menor cantidad de recipientes con *Ae. aegypti* sin *Ae. albopictus* se encontró en el parque. *Aedes albopictus* sin compartir hábitat con *Ae. aegypti* (AA) se encontró mayoritariamente en parque, el resto de los sitios presentaron las mismas proporciones. En la Tabla 4 se observa la frecuencia relativa de cada tipo de criadero dentro de cada sitio estudiado.

Tabla 4. Frecuencia de recipientes de cada categoría en los diferentes sitios de muestreo.

Sitio	AA	AAE	AE	Total
Cementerio	0,01	0,19	0,23	0,43
Gomería	0,01	0,06	0,18	0,25
Parque	0,02	0,01	0,01	0,04
Vivienda familiar	0,01	0,13	0,14	0,28
Total	0,05	0,38	0,57	1

AE: recipiente con *Aedes aegypti* sin *Ae. albopictus*; AAE: recipiente con *Ae. aegypti* y *Ae. albopictus*; AA: recipiente con *Ae. albopictus* sin *Ae. aegypti*

Distribución temporal de *Aedes aegypti* y *Ae. albopictus* en la ciudad de Eldorado, Misiones.

La presencia de inmaduros de *Ae. aegypti* y *Ae. albopictus* fue registrada durante los 24 meses de muestreo. Se observaron diferencias significativas en la abundancia de ambas especies durante los diferentes meses de muestreo ($H=80.56$; $p<0.0001$ y $H= H 79.2$; $p <0.0001$ respectivamente).

Para *Ae. aegypti*, los meses con menor abundancia media de larvas fueron: junio, agosto, septiembre y octubre de 2016; junio, julio y agosto de 2017. Las mayores abundancias medias de registraron en los meses de mayo 2016, febrero y diciembre de 2017; febrero y abril de 2018. En el caso de *Ae. albopictus* los meses de menores abundancias medias fueron: junio, julio, agosto, octubre y noviembre de 2016; agosto, septiembre y octubre de 2017. Las mayores abundancias medias se registraron en los meses de abril de 2017; febrero y marzo de 2018 (Tabla 5).

Tabla 5. Datos mensuales de *Aedes aegypti* y *Ae. albopictus*, abundancias mensuales (Ab.), abundancias medias (Ab. media), desvío estándar (DE) y *Ae. albo/Ae. aeg*: proporción de inmaduros de *Ae. albopictus* en 10 inmaduros de *Ae. aegypti*.

Mes	Ab. <i>Ae. aegypti</i>	Ab. media	DE	Ab. <i>Ae. albopictus</i>	Ab. media	DE	<i>Ae. albo/Ae. aegypti</i>
may-16	1000	32,26	60,31	68	2,19	3,86	0,7
jun-16	178	14,83	34,19	8	0,67	1,37	0,4
jul-16	293	16,28	19,81	13	0,72	2,42	0,4
ago-16	139	6,62	4,47	1	0,05	0,21	0,1
sep-16	197	8,95	16,85	58	2,64	6,78	3
oct-16	475	12,84	15,35	16	0,41	1,19	0,3
nov-16	601	19,39	26,83	17	0,55	1,55	0,3
dic-16	1051	26,95	48,71	182	4,67	13,01	2
ene-17	948	30,71	51,48	53	1,71	2,29	0,5
feb-17	1004	40,16	41,99	98	5,25	6,69	1
mar-17	1219	21,02	31,94	256	4,41	7,00	2
abr-17	842	20,54	35,22	355	8,66	22,14	4
may-17	1010	24,63	32,45	129	3,23	6,43	1
jun-17	509	14,14	18,64	177	4,92	12,96	3,5
jul-17	76	9,50	9,87	42	4,67	6,32	5,5
ago-17	295	12,83	17,99	24	1,04	2,25	1
sep-17	664	18,97	23,80	62	1,82	5,06	1
oct-17	1208	28,76	43,08	64	1,52	3,58	0,5
nov-17	1280	30,48	39,88	149	3,55	11,03	1
dic-17	1519	37,98	57,85	87	2,18	4,31	0,6
ene-18	1721	40,98	51,39	255	6,07	13,34	1,5
feb-18	1447	32,16	46,94	379	8,42	19,68	2,6
mar-18	1243	31,08	34,30	467	11,68	20,63	3,7
abr-18	1138	36,71	44,62	190	5,94	13,16	1,7

Relación entre las abundancias mensuales y las variables ambientales

Las abundancias de *Ae. aegypti* presentaron correlación significativa y positiva con la precipitación, temperatura máxima y media con uno y dos meses de retraso; temperatura mínima sin retraso, con uno y dos meses de retraso. Con la humedad relativa la correlación fue negativa con uno y dos meses de retraso (Tabla 6).

Tabla 6. Relación entre la abundancia mensual de *Aedes aegypti* y las variables ambientales de la localidad de Eldorado, Misiones.

Variable	n	coef. Spearman	p-valor
Tmin	24	0,60	0,0021
Prec 1	24	0,59	0,0048
Prec 2	24	0,79	0,0002
Tmin 1	24	0,74	0,0004
Tmin 2	24	0,78	0,0002
Tmax 1	24	0,69	0,001
Tmax 2	24	0,76	0,0002
Tmed 1	24	0,80	0,0001
Tmed 2	24	0,79	0,0002
HRmax1	24	-0,47	0,0193
HRmax2	24	-0,53	0,0108

Tmin: temperatura mínima sin retraso; Prec 1: precipitación acumulada con un mes de retraso; Prec 2: con dos meses de retraso; Tmin1: temperatura mínima mensual Prec 1: precipitación acumulada con un mes de retraso; Prec 2: con dos meses de retraso; Tmin1: temperatura mínima mensual con un mes de retraso; Tmin 2: temperatura mínima mensual con dos meses de retraso; Tmax 1: temperatura máxima con un mes de retraso; Tmax 2: temperatura máxima con dos meses de retraso; Tmed1: temperatura media con un mes de retraso; Tmed2: temperatura media con dos meses de retraso; HRmax 1: humedad relativa máxima con un mes de retraso y dos meses de retraso; HRmax 2: humedad relativa máxima con uno y dos meses de retraso.

La abundancia de *Ae. albopictus* correlacionó con las variables precipitación con dos meses de retraso (0,65; $p=0,0019$) y con la temperatura mínima y media sin retraso, con uno y dos meses de retraso (0,77; $p=0,0002$ y

0,76; $p=0,0003$) (Tabla 7). Con la humedad relativa no existió correlación. Además correlacionó con la temperatura máxima sin retraso.

Tabla 7. Relación entre la abundancia mensual de *Aedes albopictus* y las variables ambientales de la localidad de Eldorado, Misiones.

Variable	n	coef. Spearman	p-valor
Tmin	24	0,73	<0,0001
Tmed	24	0,73	<0,0001
Tmax	24	0,62	0,0012
Prec 2	24	0,65	0,0019
Tmin 1	24	0,67	0,0013
Tmin 2	24	0,77	0,0002
Tmax 1	24	0,53	0,00105
Tmax 2	24	0,68	0,0012
Tmed 1	24	0,66	0,0014
Tmed 2	24	0,76	0,0003

Tmin: temperatura mínima sin retraso; Tmed: temperatura media sin retraso; Tmax: temperatura máxima sin retraso; Prec 2: precipitación con dos meses de retraso; Tmin1: temperatura mínima mensual con un mes de retraso; Tmin 2: temperatura mínima mensual con dos meses de retraso; Tmax 1: temperatura máxima con un mes de retraso; Tmax 2: temperatura máxima con dos meses de retraso; Tmed1: temperatura media con un mes de retraso; Tmed2: temperatura media con dos meses de retraso.

Las mayores abundancias de inmaduros de ambas especies se corresponden con los valores más altos de precipitaciones con 30 y 60 días de retraso (Fig.8 y 9).

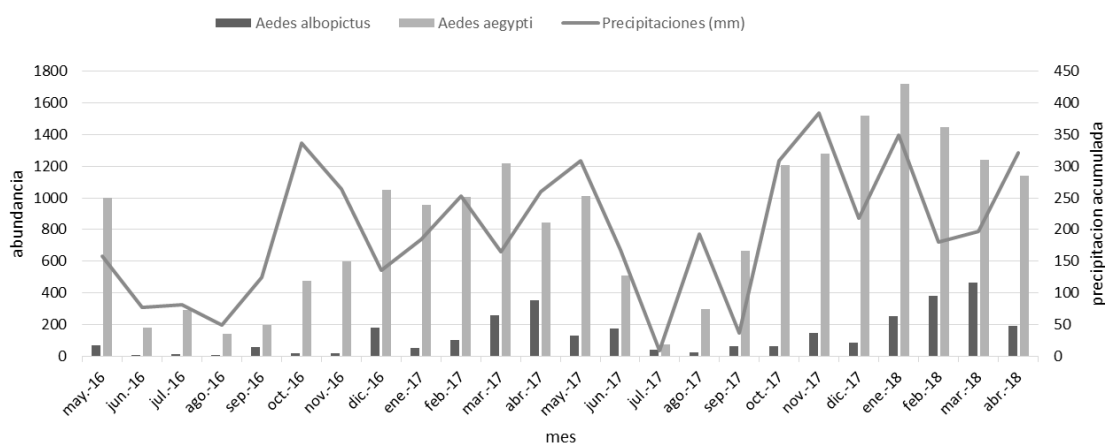


Figura 8. Distribución mensual de *Aedes aegypti* y *Ae albopictus* y las precipitaciones con 30 días de retraso en la ciudad de Eldorado, Misiones.

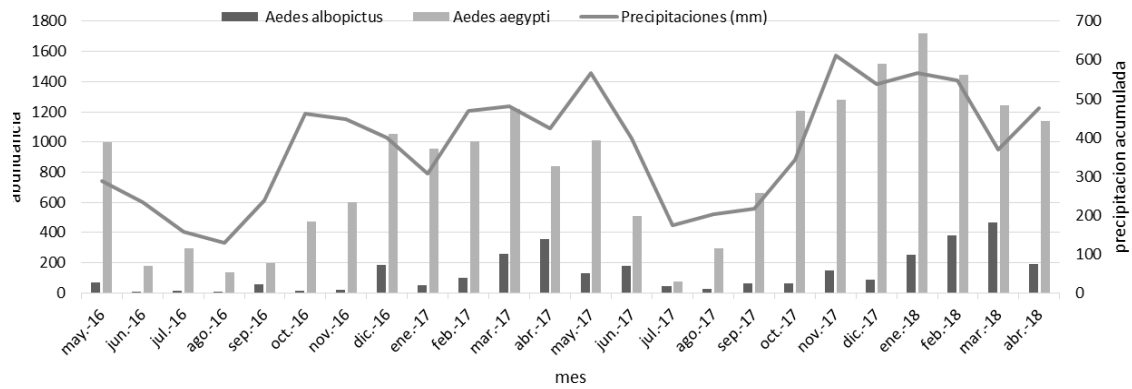


Figura 9. Distribución mensual de *Aedes aegypti* y *Ae albopictus* y las precipitaciones con 60 días de retraso en la ciudad de Eldorado, Misiones.

Se observó un aumento del número de inmaduros para ambas especies a mayor temperatura media con 30 días de retraso (Fig. 10). Las abundancias de *Ae. aegypti* y *Ae. albopictus*, fueron menores cuando la humedad relativa máxima presentó los valores más altos para 30 días de retraso, a valores superiores al 90 % de humedad se observó que las abundancias de inmaduros eran menores (Fig. 11).

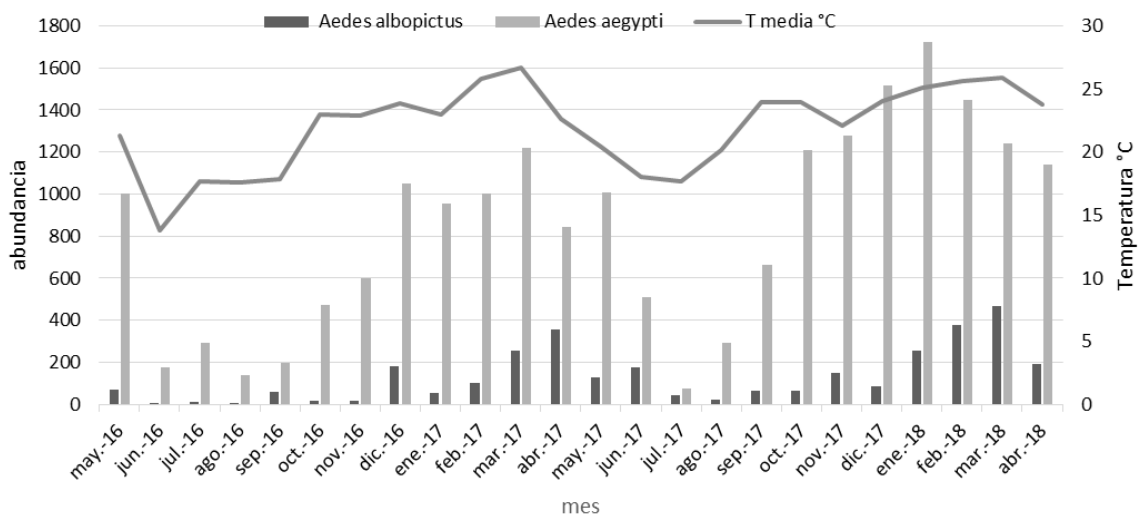


Figura 10. Distribución mensual de *Aedes aegypti* y *Ae. albopictus* y las temperaturas medias con 30 días de retraso en la ciudad de Eldorado, Misiones.

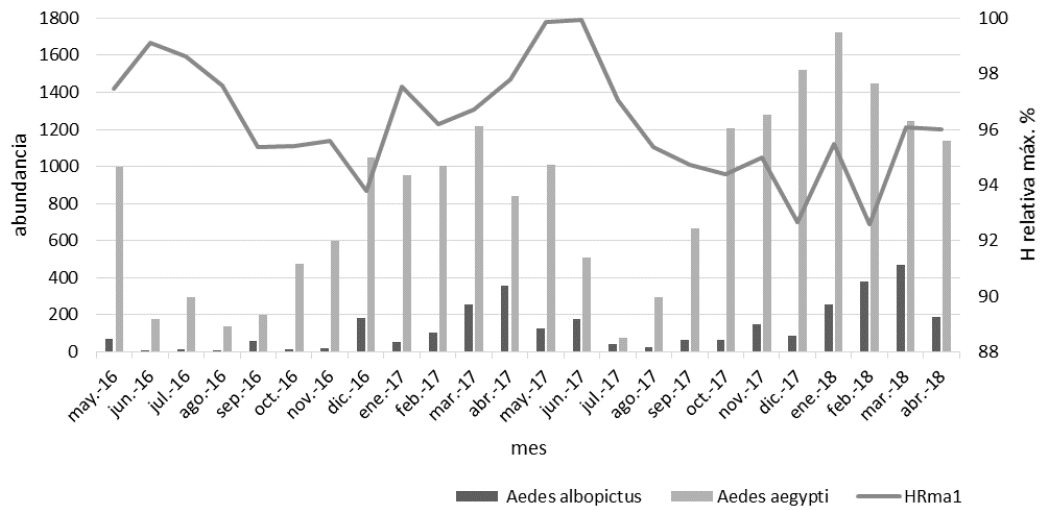


Figura 11. Distribución mensual de *Aedes aegypti* y *Ae. albopictus* y humedad relativa máxima con 30 días de retraso en la ciudad de Eldorado, Misiones.

DISCUSIÓN

Los resultados del presente estudio evidencian un amplio predominio en relación a sus abundancias de la especie *Ae. aegypti* sobre *Ae. albopictus* en la localidad de Eldorado a lo largo del período de muestreo. Aunque pudieron observarse variaciones en cuanto a la proporción de *Ae. albopictus* con respecto a *Ae. aegypti*, siendo máxima en julio de 2017 (5/10), y mínima en agosto de 2016 (0,1/10) a lo largo del período de muestreo. En 15 oportunidades esa relación fue igual o superior a lo reportado por Schweigmann *et al.* (2004) de 1/10, y similar a lo reportado por Stein (2018) de entre 1/10 a 4/10, para la misma localidad.

A diferencia en estudios de campo en EEUU (Juliano, 1998) y Brasil (Bracks *et al.*, 2003) han demostrado la superioridad competitiva de larvas de *Ae. albopictus* frente a *Ae. aegypti*, independientemente de las poblaciones de origen o de las condiciones ambientales. En el sureste de Estados Unidos, y en las Islas Bermudas se observó la evidencia más sólida de desplazamientos competitivos de *Ae. aegypti* por *Ae. albopictus* (Juliano 1998; 2004; Lounibos & Juliano, 2018). En Río de Janeiro se encontró mayor abundancia de *Ae. albopictus* con respecto *Ae. aegypti*, con proporciones de 80% y 20% respectivamente (Honório & Lourenço-de-Oliveira 2001; Honório *et al.*, 2006; Barros *et al.*, 2009).

A pesar de ello *Ae. aegypti* persiste en diferentes ciudades donde habita en simpatria con *Ae. albopictus* en el sur de Texas (Hornby *et al.*, 1994; O'Meara *et al.* 1995; Moore 1999) y en la mayoría de las ciudades en Brasil (Galardo, 2002; Passos *et al.*, 2003; Serpa *et al.* , 2006; Serpa *et al.*, 2013). Una de la explicaciones de la co-existencia es la segregación de hábitats (Hawley 1988) dónde la primera predomina en áreas urbanas mientras que la segunda en áreas rurales (Braks *et al.*, 2003). La interacción entre las características de hábitat con el clima, la resistencia de los huevos a la desecación, la selección de comida por las hembras adultas, determinan la abundancia de las especies de *Aedes* e incluso pueden ser limitantes (Vezzani *et al.*, 2001). La urbanización está generalmente asociada con el decrecimiento de la vegetación y el aumento de la densidad poblacional e infraestructura, lo que favorece a una o a otra especie (Bracks *et al.*, 2003). En el presente estudio *Ae. aegypti* fue detectado en

grandes abundancias en 3 sitios ubicados dentro del ejido urbano de Eldorado, predominando en las viviendas familiares relacionado con la mayor diversidad y disponibilidad de diferentes tipos de hábitats y la preferencia antropofílica de la especie. *Aedes albopictus* fue significativamente menos abundante en el sitio gomería, caracterizados por ser espacios abiertos o cerrados pero sin vegetación circundante, bajo techo o expuestos al sol. En contraposición *Ae. aegypti* fue muy abundante en este sitio y como lo evidencian diferentes estudios realizados en la región templada y subtropical de Argentina representa un hábitat larval importante para la especie (Stein *et al.*, 2007; Rubio *et al.*, 2011).

Nguyen *et al.* (1974) mencionan la cobertura vegetal como un factor importante que determina la presencia de *Ae. albopictus* en Vietnam y su ausencia en áreas altamente urbanizadas sin vegetación. En la ciudad de Eldorado el sitio gomería fue el que menos cobertura vegetal presentó comparado con las viviendas familiares, el cementerio y el Parque, lo que podría explicar la menor abundancia media de *Ae. albopictus* en ese sitio en relación a los otros tres y a la segregación de hábitats como un factor de la co-existencia de ambas especies en la ciudad. Estudios realizados de marcaje-liberación y recaptura de *Ae. aegypti* y *Ae. albopictus* en Brasil mostraron que la segunda puede volar entre ambientes selváticos y peridomésticos, mientras que *Ae. aegypti* tiene una menor tendencia a dispersarse en el bosque, lo que sugiere que los bosques urbanos son un importante refugio para *Ae. albopictus* (Maciel-de-freitas *et al.*, 2006). En Colombia se reportaron resultados similares asociando la distribución de *Ae. albopictus* a áreas de mayor densidad de vegetación, como los parques (Zorrilla *et al.*, 2011).

Por otro lado la segregación de hábitat puede ser más evidente en relación a las abundancias halladas de las especies pero no en cuanto a su ocurrencia en los diferentes tipos de hábitats larvales, ya que ambas especies se hallaron colonizando una gran variedad de criaderos, algo que será desarrollado con más detalle en el capítulo siguiente.

Los cementerios según lo reportado para la ciudad de Buenos Aires por Vezzani *et al.* (2001) brindan hábitats urbanos favorables para la proliferación de *Ae. aegypti*, debido a la gran cantidad de recipientes con agua, la sombra y la presencia de fuentes de alimentación para los mosquitos adultos. Antes de la

invasión de *Ae. albopictus* en EEUU, *Ae. aegypti* ocupaba principalmente los neumáticos y los recipientes en los cementerios, probablemente por la poca accesibilidad y disponibilidad de recipientes domiciliarios. Actualmente en las áreas donde *Ae. aegypti* fue desplazada por *Ae. albopictus*, esos hábitats son colonizados exclusivamente por la última especie (O'Meara *et al.*, 1995). En el presente estudio el cementerio fue el sitio con mayor proporción de criaderos compartidos por ambas especies.

Las fluctuaciones en las condiciones ambientales que afectan negativamente las abundancias de las especies pueden afectar los resultados de la competencia intra e interespecífica si las especies responden de manera diferencial a esas fluctuaciones (Chesson, 2000). Juliano (2002) propone que la coexistencia local de *Ae. aegypti* y *Ae. albopictus* es posible en el sur de Florida, porque la estacionalidad climática con estación seca y cálida favorece a *Ae. aegypti* y alivia los efectos de la competencia larval de *Ae. albopictus* por mortalidad diferencial de sus huevos. Dunson y Travis (1991) mencionan tanto factores bióticos como abióticos que pueden contribuir con los resultados de una competencia inter-específica entre especies estrechamente relacionadas y que crían en los mismos tipos de contenedores.

Los resultados del presente trabajo evidencian la presencia de *Ae. aegypti* y *Ae. albopictus* durante todo el año en la localidad de Eldorado, Misiones. Sin embargo *Ae. aegypti* muestra una más temprana y ascendente recuperación en cuanto a sus abundancias durante la primavera, con picos en el mes de enero, mientras que *Ae. albopictus* tiene abundancias fluctuantes y máximas abundancias en abril y mayo. *Aedes aegypti*, presentó las mayores abundancias durante el verano (diciembre a marzo), coincidente con las mayores temperaturas medias del área que rondan entre 23,02°C y 26,70°C con máximas de 32,52°C; y las mayores precipitaciones de la época estival. Las menores abundancias coincidieron con los meses más fríos del año con temperaturas medias entre 13,75°C y 20,12°C, con mínima de 8,91°C. En ambos casos se consideró la variable ambiental con 30 días de retraso, por lo tanto las bajas temperaturas de los meses fríos afectarían a la generación parental de los inmaduros colectados, en su actividad de alimentación, supervivencia y reproducción.

Existen otros estudios realizados en el norte de Argentina, provincia de Chaco, donde se registró mayor abundancia de huevos de *Ae. aegypti* entre noviembre y diciembre, en respuesta a las altas temperaturas y las mayores precipitaciones, con otro pico en abril, aunque menos importante coincidente con las lluvias de otoño (Stein *et al.*, 2005). En la provincia de Salta la actividad de oviposición puede ser continua durante todos los meses del año, con un pico en marzo asociado a las precipitaciones (Micieli & Campos, 2003). Para la provincia de Corrientes, Borda *et al.* (1999) registran la presencia de inmaduros durante las cuatro estaciones del año.

En São Paulo, Brasil Serpa *et al.* (2006) registran estados inmaduros de *Ae. aegypti* durante todo el año con un pico al inicio del otoño (mes de abril) y descensos al final de la estación y principios de invierno (entre los meses de abril y mayo, y junio y julio).

En cambio para la región templada de Argentina *Ae. aegypti* es encontrado desde la primavera hasta el otoño y la actividad de oviposición cesa con temperaturas por debajo de los 17°C, no registrándose actividad en la época invernal, opuesto a la región subtropical del país. Los adultos de *Ae. aegypti* no sobreviven en el otoño- invierno, si, en cambio, los huevos que darían origen a una nueva generación en la primavera siguiente (Dominguez *et al.*, 2000). Para la provincia de Buenos Aires, Campos & Maciá (1996) también reportaron que la abundancia temporal de *Ae. aegypti* estaría condicionada por la temperatura ambiente. Vezzani *et al.* (2004) reportan la presencia de inmaduros en la ciudad de Buenos Aires desde la primera semana de octubre hasta la segunda semana de julio, con la mayor abundancia el mes de marzo y disminuciones constantes entre abril y julio.

En relación a *Ae. albopictus*, detectamos mayores abundancias a fines de verano, principio de otoño (febrero, marzo y abril) coincidente con la abundancia de huevos de la especie reportado por Aponte (2017). En estos meses las temperaturas medias se encuentran entre 22,58° y 26,70°, y además coincide con las precipitaciones de otoño. Serpa *et al.* (2006) reportaron de manera similar en São Paulo un pico en abril para *Ae. albopictus*, sin embargo no lo encuentran todo el año.

Los reportes sobre los cambios en la densidad de la población de *Ae. albopictus* en respuesta a las precipitaciones son variables, esto refleja que existen sitios de reproducción dependientes e independientes de las lluvias; se podría considerar por lo tanto que las poblaciones están compuestas por dos componentes, las que se reproducen en hábitats permanentes no influenciados por la lluvia, y las poblaciones que se reproducen en hábitats creados por la lluvia y que dependen de ella. La precipitación a menudo se correlaciona con aumentos en la densidad de huevos, larvas y / o adultos en el campo, y los picos en la precipitación media semanal se correlacionan con los picos posteriores en el adulto de *Ae. albopictus* (Waldock *et al.*, 2013).

En el norte de Florida donde *Ae. albopictus* ha excluido a *Ae. aegypti* no se presentan períodos prolongados sin precipitación durante el invierno (O'Neal & Juliano, 2013). Las diferencias en la distribución geográfica de las dos especies estarían asociadas con las diferencias en la tolerancia a la desecación de los huevos (Sota *et al.*, 1992). La estación seca reduciría la supervivencia de huevos de *Ae. albopictus* lo que haría que sus abundancias sean menores al principio de la estación lluviosa que al final de la misma (Juliano *et al.*, 2002). Por lo que el secado de los contenedores contribuiría a la coexistencia de estos dos competidores.

En el presente trabajo las variables ambientales que correlacionaron de manera significativa y positiva con las abundancias de ambas especies fueron las precipitaciones con dos meses de retraso, la temperatura mínima sin retraso y la temperatura media mensual a uno y dos meses de retraso, similar a lo reportado por Estallo *et al.* (2015) para *Ae. aegypti* en Orán en la provincia de Salta, donde la precipitación y la temperatura mínima son las variables climáticas que más influyen sobre las abundancias de la especie. Para la provincia de Buenos Aires, Campos & Maciá (1996) encuentran que la abundancia relativa temporal de *Ae. aegypti* está más relacionada con la temperatura ambiente que con las precipitaciones. En la provincia de Misiones, Aponte *et al.* (2018) encuentran que la temperatura era la única variable relacionada a la actividad de oviposición de ambas especies. En Brasil se detecta también que la temperatura y la precipitación están significativamente relacionadas a la abundancia de ambas especies de vectores, donde los períodos de mayores precipitaciones

presentan las mayores abundancias (Marques & De Castro Gomes, 1997; Honório & Lourenço-de-Oliveira, 2005; Honório *et al.*, 2009; Rodrigues *et al.*, 2015). En el presente estudio *Ae. aegypti* además correlacionó de manera positiva con la precipitación con un mes de retraso lo que favorecería la presencia temprana de larvas de la especie en los diferentes tipos de hábitats en relación a la presencia de larvas de *Ae. albopictus*.

En relación a los efectos de la temperatura sobre la tasa de crecimiento y densidad de *Ae. albopictus*, Alto & Juliano (2001) estudiando poblaciones de la especie de Estados Unidos proponen que las poblaciones de temperaturas más cálidas (Sur de EEUU) tienen mayor tasa de crecimiento al principio de la estación favorable donde se presentan picos de abundancia, pero una densidad relativamente baja de adultos. En poblaciones templadas más frías (Norte de EEUU) presentan un crecimiento más lento, pero una producción más estable de adultos a lo largo de la temporada y alcanzan mayores densidades máximas. En las regiones de climas templados tales como medio-oeste de Estados Unidos y Japón, la estación activa de *Ae. albopictus* es la primavera tardía y el otoño temprano (Alto & Juliano, 2001).

En relación a la humedad, altos porcentajes de humedad relativa afectan la supervivencia y longevidad de huevos y mosquitos adultos como fue demostrado en diferentes trabajos (Fay, 1964; Mogi *et al.*, 1996; Reiskind *et al.*, 2009; Waldoock *et al.*, 2013). *Aedes albopictus* y *Ae. aegypti* sobreviven en un amplio rango de humedad relativa, de todas formas existen escasos estudios de los efectos de la humedad relativa sobre la supervivencia de huevos y adultos, siendo uno de los factores complejos a la hora de estudiar dado que la temperatura y la humedad relativa no son independientes (Waldoock *et al.*, 2013). Generalmente en un rango de 60-90% de humedad relativa se observa poca diferencia en la supervivencia de los adultos. Mogi *et al.* (1996) encontraron una correlación negativa entre la humedad relativa y la supervivencia de adultos a valores de 70 % para *Ae. aegypti*, y 90 % para *Ae. albopictus*. En coincidencia en el presente trabajo, se observó una disminución de la abundancia de inmaduros con humedad relativa mayor al 90% con 30 días de retraso, por lo tanto estos valores afectarían a la generación parental de las larvas colectadas. En el análisis sin retraso no observamos correlación con la humedad relativa.

O'Neal & Juliano (2013) encuentran que la estación húmeda ocasiona una mayor mortalidad de huevos de *Ae. albopictus* comparada con la estación seca, mientras que para *Ae. aegypti* no registran diferencias, algo para lo que no hallan explicación, pero especulan con la posibilidad de que la especie sea afectada por bacterias u hongos.

Las diferencias estacionales en respuesta a las variables ambientales entre las dos especies podrían minimizar la aptitud diferencial entre las mismas, estabilizando los mecanismos que producen la coexistencia entre ambas o prolongando el tiempo esperado para la exclusión competitiva (O'Neal & Juliano, 2013). Los resultados expuestos permiten suponer que ambas especies responden de manera diferente a las características ambientales y de hábitat, lo que requiere de mayores estudios experimentales y a campo que permitan dilucidar los mecanismos que están actualmente permitiendo su co-existencia.

Asimismo el hecho de que las dos especies co-ocurrán en todos los sitios muestreados, un cambio en las densidades relativas de las especies podría ocurrir sin tiempo de retraso a partir de cambios en el hábitat, revirtiendo la situación de dominancia.

BIBLIOGRAFÍA

Almeida Costa, E. A. P. de, Mendonça Santos, E. M. de, Correia, J. C., & Albuquerque, C. M. R. de. (2006). Impact of small variations in temperature and humidity on the reproductive activity and survival of *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae). *Revista Brasileira de Entomologica*, 54(3), 488–493.

Alto, B. W., & Juliano, S. A. (2001). Temperature Effects on the Dynamics of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) Populations in the Laboratory. *Journal of Medical Entomology*, 38(4), 548–556. <https://doi.org/10.1603/0022-2585-38.4.548>

Aponte, C. A., Faraone, J., Etchepare, E., Marin, S., Gimenez, J., Bangher, D., Stein, M. (2018). Variación temporal y selección de hábitats de *Aedes aegypti* (Linnaeus) y *Aedes albopictus* (Skuse) (Diptera: Culicidae) en la ciudad de Eldorado, Misiones. In A. Visintin (Ed.), *XI Jornadas Regionales sobre Mosquitos-* (p. 39). La Rioja.

Azil, A. H., Long, S. A., Ritchie, S. A., & Williams, C. R. (2010). The development of predictive tools for pre-emptive dengue vector control: A study of *Aedes aegypti* abundance and meteorological variables in North Queensland, Australia. *Tropical Medicine and International Health*, 15(10), 1190–1197. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3156.2010.02592.x>

Barros, F. S. M. de, Honório, N. A., Magalhães, M. de A. F. M., Sabroza, P. C., & Castro, M. G. (2009). The spatial distribution of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in a transition zone, Rio de Janeiro, Brazil. *Cadernos de Saúde Pública*, 25(6), 1203–1214. <https://doi.org/10.1590/s0102-311x2009000600003>

Beserra, E. B., Castro Jr., F. P. de, Santos, J. W. dos, Santos, T. da S., & Fernandes, C. R. M. (2006). Biología e exigências térmicas de *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) provenientes de quatro regiões bioclimáticas da Paraíba. *Neotropical Entomology*, 35(6), 853–860. <https://doi.org/10.1590/s1519-566x2006000600021>

Braks, M. A. H., Honório, N. A., Lounibos, L. P., Lourenço-De-Oliveira, R., & Juliano, S. A. (2004). Interspecific Competition between Two Invasive

Species of Container Mosquitoes, *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae), in Brazil. *Annals of the Entomological Society of America*, 97(1), 130–139. [https://doi.org/10.1603/0013-8746\(2004\)097\[0130:ICBTIS\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1603/0013-8746(2004)097[0130:ICBTIS]2.0.CO;2)

Burgos JJ, Curto de Casas SI, Carcavallo RU, Galíndez Girón I. 1994. Global climate change influence in the distribution of some pathogenic complexes (Malaria and Chagas disease) in Argentina. *Entom Vect.* 1: 69- 78

Calado, D. C., & Navarro-Silva, M. A. (2008). Influência da temperatura sobre a longevidade, fecundidade e atividade hematofágica de *Aedes* (*Stegomyia*) *albopictus* Skuse, 1894 (Diptera, Culicidae) sob condições de laboratório. *Revista Brasileira de Entomologia*, 46(1), 93–98. <https://doi.org/10.1590/s0085-56262002000100011>

Canyon, D. V., Hii, J. L. K., & Müller, R. (1999). Adaptation of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) oviposition behavior in response to humidity and diet. *Journal of Insect Physiology*, 45(10), 959–964. [https://doi.org/10.1016/S0022-1910\(99\)00085-2](https://doi.org/10.1016/S0022-1910(99)00085-2)

Chesson P. Mechanisms of maintenance of species diversity. *Annu Rev Ecol Syst* 2000; 31:343–366. Christophers, R. *Aedes aegypti* (L.) the yellow fever mosquito: its life history, bionomics and structure. Cambridge University Press; Cambridge: 1960.

Couret, J., Dotson, E., & Benedict, M. Q. (2014). Temperature, larval diet, and density effects on development rate and survival of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *PLoS ONE*, 9(2). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0087468>

Díaz-Nieto, L. M., Maciá, A., Perotti, M. A., & Berón, C. M. (2013). Geographical Limits of the Southeastern Distribution of *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae) in Argentina. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 7(1), e1963. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001963>

Dominguez, M. C., Ludueña-Almeida, F. F. ., & Almirón, W. R. (2000). Dinámica poblacional de *Aedes aegypti* (Díptera: Culicidae) en Córdoba capital. *Revista de La Sociedad Entomológica Argentina*, 59(1–4), 41–50.

Retrieved from
https://ri.conicet.gov.ar/handle/11336/67243%0Ahttp://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0373-56802016000200002

Dueñas, J. C. R., Llinás, G. A., Panzetta-Dutari, G. M., & Gardenal, C. N. (2009). Two Different Routes of Colonization of *Aedes aegypti* in Argentina From Neighboring Countries. *Journal of Medical Entomology*, 46(6), 1344–1354. <https://doi.org/10.1603/033.046.0613>

Dunson, W. A., and J. Travis. 1991. The role of abiotic factors in community organization. *Am. Nat.* 138: 1067–1091.

Espinosa, M., D, W., A., G., & M, A. (2007). Primer registro de *Aedes albopictus* (Skuse) (Diptera: Culicidae) en la ciudad de Puerto Iguazú, Misiones, Argentina. *Revista Argentina de Zoonosis y Enfermedades Infecciosas Emergentes*, 24–26.

Estallo, E. L., Ludueña-Almeida, F. F., Introini, M. V., Zaidenberg, M., & Almirón, W. R. (2015). Weather variability associated with *Aedes* (*Stegomyia*) *aegypti* (Dengue Vector) oviposition dynamics in Northwestern Argentina. *PLoS ONE*, 10(5), 1–11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0127820>

Fay, R. W. (1964). The Biology and Bionomics of *Aedes aegypti* in the laboratory. *Mosquito News*, 24(3), 300–308.

Galardo, A. 2002. A dispersão *Aedes* (*Stegomyia*) *aegypti* (Linnaeus 1762) e *Aedes* (*Stegomyia*) *albopictus* no estado do Rio de Janeiro e sua relação com a transmissão de dengue. M.S. thesis, Universidade Federal rural do Rio de Janeiro, Brazil

Gardenal, C. N. (2011). Desde la genética de poblaciones, aportes al conocimiento de la historia natural de algunas zoonosis. *BAG - Journal of Basic and Applied Genetics*, 22(1).

Grech, M. G., Ludueña-Almeida, F., & Almirón, W. R. (2010). Bionomics of *Aedes aegypti* subpopulations (Diptera: Culicidae) from Argentina. *Journal of Vector Ecology*, 35(2), 277–285. <https://doi.org/10.1111/j.1948-7134.2010.00083.x>

Honório, N.A., Cabello, P.H., Codeço, C.T., Lourenço-de-Oliveira, R. (2006). Preliminary data on the performance of *Aedes albopictus* immatures developing in water-field tires in Rio de Janeiro. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 101(2), 225–228. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762006000200017>

Honório, N. A., Codeço, C. T., Magalhães, M. A. F. M., Lourenço-de-Oliveira, R., & Alves, F. C. (2009). Temporal Distribution of *Aedes aegypti* in Different Districts of Rio De Janeiro, Brazil, Measured by Two Types of Traps. *Journal of Medical Entomology*, 46(5), 1001–1014. <https://doi.org/10.1603/033.046.0505>

Honório, N. A., & Lourenço-de-Oliveira, R. (2001). Freqüência de larvas e pupas de *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* em armadilhas, Brasil. *Revista de Saúde Pública*, 35(4), 385–391. <https://doi.org/10.1590/s0034-89102001000400009>

Hornby, J. A., Moore, D. E., & Miller, T. W. (1994). *Aedes albopictus* distribution, abundance, and colonization in Lee County, Florida, and its effect on *Aedes aegypti*. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 10(3), 397–402.

Kingsolver, J. G., & Huey, R. B. (2008). Size, temperature, and fitness: three rules. *Evolutionary Ecology Research*, 10(2), 251–268. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2231624>

Lizuain, A. A., Leporace, M., Santini, M. S., & Schweigmann, N. (2016). Presencia y abundancia relativa de *Aedes albopictus* y *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) según dimensiones de recipiente de cría en dos municipios de la provincia de Misiones, Argentina Arturo. In C. Berón & L. D.-N. Instituto (Eds.), *X Jornadas Regionales sobre Mosquitos* (p. 53). Mar del Plata.

Lopes, J., Castilho Martins, E. A., De Oliveira, O., De Oliveira, V., De Oliveira Neto, B. P., & De Oliveira, J. E. (2004). Dispersion of *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) and *Aedes albopictus* (Skuse, 1894) in the Rural Zone of North Paraná State. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 47(5),

739–746.

Lounibos, L. P., & Juliano, S. A. (2018). Where vectors collide: the importance of mechanisms shaping the realized niche for modeling ranges of invasive *Aedes* mosquitoes. *Biological Invasions*, 20(8), 1913–1929. <https://doi.org/10.1007/s10530-018-1674-7>

Maciel-de-freitas, R., Neto, R. B., Gonçalves, J. M., Codeço, C. T., & Lourenço-de-oliveira, R. (2006). Movement of Dengue Vectors between the Human Modified Environment and an Urban Forest in Rio de Janeiro. *Journal of Medical Entomology*, 43(6), 1112–1120. <https://doi.org/10.1093/jmedent/43.6.1112>

Marques, G. R. A. M., & De Castro Gomes, A. (1997). Comportamento antropofílico de *Aedes albopictus* (Skuse) (Diptera: Culicidae) na região do Vale do Paraíba, Sudeste do Brasil. *Revista de Saude Publica*, 31(2), 125–130.

Mogi, M., Miyagi, I., Abadi, K., & Syafruddin. (1996). Inter- and Intraspecific Variation in Resistance to Desiccation by Adult *Aedes* (Stegomyia) spp. (Diptera: Culicidae) from Indonesia. *Journal of Medical Entomology*, 33(1), 53–57. <https://doi.org/10.1093/jmedent/33.1.53>

Moore, C. G. 1999. *Aedes albopictus* in the United States: current status and prospects for further invasion. *J. Am. Mosq. Cont. Assoc.* 15: 221Ð227.

Muttis, E., Balsalobre, A., Mangudo, C., Ciota, A. T., Kramer, L. D., Micieli, M. V., & Chuchuy, A. (2018). Factors Related to *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) Populations and Temperature Determine Differences on Life-History Traits With Regional Implications in Disease Transmission. *Journal of Medical Entomology*, (May), 1–8. <https://doi.org/10.1093/jme/tjy057>

Nance, J., Fryxell, R. T., & Lenhart, S. (2018). Modeling a single season of *Aedes albopictus* populations based on host-seeking data in response to temperature and precipitation in eastern Tennessee. *Journal of Vector Ecology*, 43(1), 138–147. <https://doi.org/10.1111/jvec.12293>

Nguyen, D.Q., Dihn, V.R. & Chow, C.Y. (1974) *Aedes* mosquito surveillance in the republic of Vietnam. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and*

Public Health, 5,569-573.

O'Neal, P. A., & Juliano, S. A. (2013). Seasonal variation in competition and coexistence of *Aedes* mosquitoes: Stabilizing effects of egg mortality or equalizing effects of resources? *Journal of Animal Ecology*, 82(1), 256–265. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2656.2012.02017.x>

Passos, R. A., Marques, G. R. A. M., Voltolini, J. C., & Condino, M. L. F. (2003). Dominance of *Aedes aegypti* over *Aedes albopictus* in the southeastern coast of Brazil]. *Revista de Saude Publica*, 37(6), 729–734. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14666302>

Reinhold, J. M., Lazzari, C. R., & Lahondère, C. (2018). Effects of the environmental temperature on *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* mosquitoes: A review. *Insects*, 9(4). <https://doi.org/10.3390/insects9040158>

Rossi, G. C. (2015). Annotated checklist, distribution, and taxonomic bibliography of the mosquitoes (Insecta: Diptera: Culicidae) of Argentina. *Check List*, 11(4), 1–15. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001963>

Rubio, A., Cardo, M. V., & Vezzani, D. (2011). Tire-breeding mosquitoes of public health importance along an urbanisation gradient in Buenos Aires, Argentina. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 106(6), 678–684. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762011000600006>

Rueda, L. M., Patel, K. J., Axtell, R. C., & Stinner, R. E. (1990). Temperature-dependent development and survival rates of *Culex quinquefasciatus* and *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Journal of Medical Entomology*, 27(5), 892–898. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2231624>

Schweigmann, N., Vezzani, D., Orellano, P., Kuruc, J., & Boffi, R. (2004). *Aedes albopictus* in an area of Misiones, Argentina. *Revista de Saude Publica*, 38(1), 136–138. <https://doi.org/10.1590/S0034-89102004000100020>

Serpa, L. L. N., Martins Costa, K. V. R., Voltolini, J. C., & Ina, K. (2006). Variação sazonal de *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* no município de Potim, São Paulo. *Rev Saúde Pública*.

Serpa, L. L. N., Monteiro Marques, G. R. A., De Lima, A. P., Voltolini, J. C., Arduino, M. D. B., Barbosa, G. L., ... De Lima, V. L. C. (2013). Study of the distribution and abundance of the eggs of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* according to the habitat and meteorological variables, municipality of São Sebastião, São Paulo State, Brazil. *Parasites and Vectors*, 6(1). <https://doi.org/10.1186/1756-3305-6-321>

Sota, T., and M. Mogi. 1992. Interspecific variation in desiccation survival time of *Aedes* (Stegomyia) mosquito eggs is correlated with habitat and egg size. *Oecologia* 90: 353–35

Stein, M., Almirón, W. R., F, L. A., Zapata, L., Mari, E., & Gorodner, J. O. (2007). *Aedes aegypti* y culícidos asociados (Diptera: Culicidae) en la ciudad de. *Www.Siicsalud.Com/Dato/Dat051/06d28002.Htm*. Stein, (6), 52–58. Retrieved from www.siicsalud.com/dato/dat051/06d28002.htm.%0AStein

Tejerina, E. F., Almeida, F. F. L., & Almirón, W. R. (2009). Bionomics of *Aedes aegypti* subpopulations (Diptera: Culicidae) from Misiones Province, northeastern Argentina. *Acta Tropica*, 109(1), 45–49. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2008.09.014>

Vezzani, D., & Carbajo, A. E. (2008). *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus*, and dengue in Argentina: Current knowledge and future directions. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 103(1), 66–74. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762008005000003>

Vezzani, D., Velázquez, S. M., Soto, S., & Schweigmann, N. J. (2001). Environmental Characteristics of the Cemeteries of Buenos Aires City (Argentina) and Infestation Levels of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 96(4), 467–471. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762001000400005>

Waldock, J., Chandra, N. L., Lelieveld, J., Proestos, Y., Michael, E., Christophides, G., & Parham, P. E. (2013). The role of environmental variables on *Aedes albopictus* biology and chikungunya epidemiology. *Pathogens and Global Health*, 107(5), 224–241.

<https://doi.org/10.1179/2047773213y.0000000100>

Zorrilla, A., Quintero, L., Del Ventura, F., Muñoz, M., Moncada, N., & Navarro, J. C. (2011). Ecological notes of *Aedes albopictus* (Skuse, 1894) in Caracas city, Venezuela. *Boletín de Malariología y Salud Ambiental*, 51(2), 229–235. Retrieved from <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-83255164791&partnerID=40&md5=ee2556d072c5e29f3151a1ea92e4494b>

CAPÍTULO 2

Hábitats larvales de *Aedes aegypti* (Linnaeus) y
Ae. albopictus (Skuse) en la localidad de
Eldorado, Misiones

INTRODUCCIÓN

La selección de un sitio de ovoposición que garantice la supervivencia de los huevos y las larvas es un paso crítico en el proceso reproductivo de Culicidae, los peligros asociados a los ambientes acuáticos efímeros, la exposición a condiciones ambientales adversas y la ausencia de nutrición larval hacen que la selección cuidadosa del sitio de ovoposición sea extremadamente importante (Day, 2016).

Dentro de los ambientes urbanos y semiurbanos existen “microhábitats artificiales”, denominación dada a contenedores manufacturados por el hombre propicio para el desarrollo de estados inmaduros de ciertas especies de mosquitos, constituyéndose en hábitats larvales importantes. En los domicilios, peridomicilios y lugares públicos existe una amplia variedad de contenedores artificiales factibles de convertirse en sitios de cría de mosquitos, y a nivel mundial son mayoritariamente ocupados por *Aedes aegypti* Linnaeus, *Ae. albopictus* (Skuse) y especies pertenecientes al complejo *Culex pipiens* Linnaeus (Grech & Ludueña-Almeida, 2016).

Un importante foco de producción de Culicidae dentro de los ambientes urbanos lo constituyen los cementerios, que poseen una gran cantidad de recipientes propicios para el desarrollo de mosquitos, además de otros recursos como la disponibilidad de fuentes azucaradas vegetales, fuentes de sangre y refugio (Vezzani *et al.*, 2001; Vezzani *et al.*, 2005; Vezzani, 2007). Las gomerías también representan otro foco importante, con la acumulación a cielo abierto de neumáticos en desuso y partes de vehículos abandonados, los cuales son usados como hábitat de reproducción de especies de importancia sanitaria, además de un medio de introducción y distribución de las mismas (Yee, 2008; Yee *et al.*, 2010; Rubio *et al.*, 2011).

Las características espaciales y las microambientales del hábitat son aspectos fundamentales en la productividad del criadero y por ende en la historia de vida del mosquito, influyendo tanto en la supervivencia como en la dinámica de la población (Bentley & Day, 1989; Vezzani *et al.*, 2005). Entre los factores del microhábitat que se correlacionan con la presencia de estados inmaduros de

Aedes spp. se encuentra la exposición a la luz y la vegetación, la disponibilidad de alimento, la ocurrencia de interacciones inter e intra específicas (competencia y depredación), el pH, la temperatura y la salinidad del agua del criadero (Vezzani *et al.*, 2001; Vezzani & Schweigmann, 2002).

La presencia del hombre contribuye a la rápida adaptación de *Ae. albopictus* a nuevos entornos, el cual se reproduce en una amplia variedad de recipientes y, en las áreas donde ambas especies cohabitan, sus larvas a menudo se encuentran en el mismo recipiente de cría (Braks *et al.*, 2003; Waldock *et al.*, 2013 Grech & Ludueña-Almeida, 2016).

Los pocos estudios realizados en Argentina hallaron a ambas especies cohabitando en recipientes artificiales como: jarras, latas, cacerolas, baldes, botellas plásticas cortadas, lonas y neumáticos en desuso en El Soberbio y Eldorado, provincia de Misiones (Rossi *et al.* 1999; Lizuain *et al.*, 2016, Stein *et al.*, 2016). Numerosos y más conocidos son los estudios referidos a los microhábitats artificiales más utilizados por *Ae. aegypti* a saber: los recipientes cilíndricos, de boca ancha y poco profundos (floreros, latas, baldes y neumáticos en desuso), bebederos de animales, cubiertas de auto en desuso (Rossi & Almirón, 2004; Vezzani & Carbajo, 2008; Grech & Ludueña-Almeida, 2016) en regiones templadas y floreros, recipientes de plástico, neumáticos, botellas, baldes y tachos en regiones tropicales (Stein *et al.*, 2005).

En relación a los estudios que detectaron *Ae. albopictus* en hábitats naturales se conoce la cita de Stein *et al.*, (2016) que la encuentra en bromelias silvestres y ornamentales, bráctea de palmera caída, hueco de árbol y tocón de tacuara en Eldorado. En Argentina se ha encontrado *Ae. aegypti* en hueco de árbol en la provincia de Salta, en vainas foliares (axilas) de Aráceas en la provincia de Misiones y en bromelias epífitas en la provincia de Tucumán (Mangudo *et al.*, 2010; Campos *et al.*, 2011; Stein *et al.*, 2013). En Eldorado a partir del presente estudio se la detecta por primera vez en tocón de tacuara, coexistiendo con *Ae. albopictus* (datos no publicados). Estos hallazgos estarían apoyados por estudios moleculares que determinaron que las poblaciones de Argentina de *Ae. aegypti* tienen una mezcla de las dos formas de *Ae. aegypti*, la variedad *formosus* y la variedad *aegypti aegypti*, y parte de las consecuencias

de la mezcla genética de ambas variedades, es que el mosquito pueda encontrarse en hábitat más naturales (Gloria-Soria *et al.*, 2016).

Con el fin de ampliar los conocimientos sobre los microhábitats más utilizados por *Ae. aegypti* y *Ae. albopictus*, junto a las condiciones físico químicas de los mismos en la región noreste del país; se proponen los siguientes objetivos:

- Determinar la abundancia de *Ae. aegypti* y *Ae. albopictus* colectadas en diferentes tipos de hábitats naturales y artificiales de la localidad de Eldorado, Misiones.
- Identificar los hábitats más productivos para ambas especies.
- Estudiar la correlación entre la abundancia de ambas especies y las variables microambientales del hábitat.

MATERIALES Y MÉTODOS

El sitio de estudio y las variables registradas fueron descritas en el capítulo 1. Para el presente estudio sólo se han considerado los recipientes positivos para Culicidae. Los hábitats artificiales se clasificaron según el tamaño en: pequeño (<2 litros), mediano (2-30 litros) y grande (>30 litros), y fueron agrupados según su material de construcción (vidrio, plástico, cerámica, etc.); los tanques de agua por su gran volumen y uso se agruparon separados del resto. Los hábitats naturales se reunieron en una sola categoría (Tabla 1). Además los hábitats larvales fueron clasificados en otras tres categorías: presencia de *Aedes aegypti* (AE) sin presencia de *Ae. albopictus*, presencia de *Ae. albopictus* sin *Ae. aegypti* (AA) y presencia de ambas especies (AAE). No se ha considerado la presencia de otros culícidos en esta clasificación de hábitats.

Tabla 1. Categorías de recipientes utilizados como hábitats por *Aedes aegypti* y *Ae. albopictus* en la localidad de Eldorado, Misiones.

categoría	descripción
chatarra	autopartes abandonados, restos de electrodomésticos
lona	depressiones formadas en las lonas abandonadas o cubriendo algún material por ej. arena
caucho	neumáticos de motos, autos, camionetas, tractores, máquinas viales
tanque de agua	recipientes de gran tamaño para acumulación de agua de riego
recipiente de cemento	depressiones formadas por las lápidas u orificios para depósito de flores en las tumbas de los cementerios.
recipiente de cerámica	floreros, jarrones, adornos de cementerio
recipiente de metal	latas, utensilios de cocina descartados
recipiente natural	tocón de tacuara (tacuara cortada de manera transversal por el hombre), bromelias, huecos de árboles
recipiente plástico	juguets, platos de mascotas, utensilios de cocina
recipiente de vidrio	frascos, floreros, botellas
otros	macetas, lanchas abandonadas, vasijas , bolsas de polietileno

Análisis de datos

Los análisis fueron realizados con el software estadístico InfoStat /E versión 2018 (Di Rienzo *et al.*, 2018). Para analizar la existencia de diferencias significativas entre las abundancias de inmaduros de las dos especies en los diferentes tipos de hábitats se utilizó el test no paramétrico de *Kruskal-Wallis*. A

partir del hallazgo de diferencias significativas se realizó una prueba de comparaciones de a pares entre hábitats. Para analizar las abundancias de las categorías AA, AE y AAE, en cada uno de los distintos tipos de hábitats naturales y artificiales se utilizó Chi cuadrado de *Pearson*.

Para analizar la existencia de correlación entre las abundancias de cada especie y las variables microambientales del hábitat se utilizó el coeficiente de correlación de *Spearman*.

Se realizó un análisis de correspondencia múltiple (ACM) para estudiar la relación entre la presencia y/o abundancia de las dos especies y los tipos de hábitats en las que fueron halladas. Este análisis es una técnica multivariada descriptiva y exploratoria, por lo que para su uso las variables fueron categorizadas y tratadas como variables cualitativas.

RESULTADOS

En la ciudad de Eldorado, Misiones, entre mayo de 2016 y abril de 2018 el número total de recipientes encontrados con inmaduros de culícidos en los diferentes sitios (viviendas familiares, gomerías, cementerios y parque) fue de 1272, dónde *Aedes aegypti* y *Ae. albopictus* fueron halladas en el 63% de los mismos. Se han encontrado diferentes tipos de hábitats distribuidos en los 4 sitios de muestreo (Tabla 1). Los hábitats naturales estuvieron representados por bromelias, hueco de árbol y tocón de tacuara, y dentro de los hábitats artificiales se encontraron lonas, juguetes plásticos, bebederos de mascotas, neumáticos, chatarras, frascos, tanques de agua, botellas de vidrio y plástico, etc. (Figs. 1 y 2).

Tabla 1. Porcentaje de cada tipo de recipiente positivo para larvas de *Aedes* spp. hallado en los diferentes sitios de muestro de la localidad de Eldorado, Misiones. Entre paréntesis se encuentra el número de recipientes correspondiente a cada porcentaje.

Tipo de recipiente	Vivienda familiar	Cement.	gomería	parque	N total
chatarra	57,9 (11)	5,3 (1)	36,8 (7)	0	19
vidrio	1,96 (3)	97,4 (149)	0,65 (1)	0	153
tanque de agua	93,3 (14)	0	6,7 (1)	0	15
lona	58,3 (14)	4,2 (1)	37,5 (9)	0	24
caucho (neumático)	19,4 (42)	0,5 (1)	80,1 (173)	0	216
otros	50,0 (3)	50,0 (3)	0	0	6
cemento	3,1 (1)	96,9 (32)	0	0	32
cerámica	5,0 (1)	95,0 (20)	0	0	21
metal	67,6 (23)	32,4 (11)	0	0	34
natural	9,5 (4)	2,4 (1)	0	88,1 (37)	42
plástico	43,0 (99)	54,4 (125)	2,6 (6)	0	230



Figura 1. Hábitats naturales donde se halló *Aedes aegypti* y *Ae. albopictus* en la localidad de Eldorado, Misiones. A y D: hueco de árbol, B: bromelia, C: tocón de tacuara.



Figura 2. Hábitats artificiales donde se halló *Aedes aegypti* y *Ae. albopictus* en la localidad de Eldorado, Misiones. A y B: recipientes plásticos, C: recipiente de cemento en tumba de cementerio, D: tanque de agua, E: neumático, F: lona, G: frasco de vidrio.

Las abundancias de *Ae. aegypti* y *Ae. albopictus* presentaron diferencias significativas según el tipo de recipiente utilizado como hábitat ($H=76,62$, $p<0.0001$ y $H=38,17$, $P<0.001$). Tanto para *Ae. aegypti* como para *Ae. albopictus*, las mayores abundancias de estados inmaduros se encontraron en los recipientes agrupados como “otros”. Bajo esta categoría se encontraron una lancha, una bolsa de polietileno y una maceta de gran volumen conteniendo plantas acuáticas ubicadas en viviendas familiares. Los restantes recipientes de esta categoría eran vasijas de barro ubicadas bajo la sombra parcial, en el cementerio.

Las abundancias medias de *Ae. aegypti* halladas en la categoría “otros”, se diferenciaron significativamente con la categoría cerámica, caucho, vidrio, plástico y natural. En el caso de *Ae. albopictus* las abundancias medias de

inmaduros halladas en la categoría “otros” se diferenciaron significativamente de las abundancias medias halladas en caucho y tanque de agua (Tabla 2).

Tabla 2. Abundancias medias de *Ae. aegypti* y *Ae. albopictus* en los diferentes tipos de hábitats en la localidad de Eldorado, Misiones.

Tipo de hábitat	Ab. <i>Aedes aegypti</i>	DE	*	Ab. <i>Ae. albopictus</i>	DE	*
chatarra	36,05	43,5	CD	1,74	2,47	AB
lona	35,67	61,7	BCD	2,67	5,43	AB
caucho	25,79	34,7	BC	1,38	4,38	A
otros	59,33	44,3	D	20,67	37,49	B
cemento	27,69	33,9	CD	6,34	13,02	B
cerámica	11,10	11,8	B	4,86	12,82	AB
metal	42,36	64,8	BD	11,79	21,70	B
natural	2,02	3,44	A	2,31	3,75	B
plástico	29,60	44,8	BC	4,53	12,21	AB
vidrio	18,11	28,5	BC	5,14	12,52	B
tanque de agua	28,6	32,0	BCD	1,14	4,00	A

*: Test de prueba de comparaciones de a pares: medias con una letra común no presentan diferencias significativas ($p > 0,05$); Desvío estándar (D.E.)

Los criaderos estuvieron ubicados bajo sombra parcial o pleno sol y la temperatura del agua osciló entre 5,4 y 37,1°C. Algunos presentaban materia orgánica e incluso olor desagradable. El agua de los criaderos fue mayoritariamente clara, de color marrón, con pH que osciló entre 3,17 y 12,11. La abundancia de *Ae. aegypti* se correlacionó de manera significativa y positiva con la temperatura del agua (0,12, $p=0,0008$). *Aedes albopictus* presentó una correlación significativa aunque negativa con el pH, y positiva con la temperatura (-0,16, $p<0,0001$; 0,12, $p= 0,0005$).

Las categorías AA, AE y AAE se distribuyeron de manera significativamente diferente entre los diferentes tipos de hábitats naturales y artificiales (Chi cuadrado de *Pearson* 228.99, $p< 0.001$). *Aedes albopictus* sin *Ae. aegypti* se encontró mayoritariamente en recipientes naturales (tocón de tacuara, bromelia y huecos de árboles), con pH ácido (media de 5,45), con temperaturas del agua que variaron entre 18,8°C y 28,2°C (media de 23,33° C), ubicados a la sombra parcial. *Aedes aegypti* habitando sin *Ae. albopictus*, se encontró en mayor número en neumáticos (categoría caucho), recipientes plásticos y recipientes de vidrio, que presentaron pH básico con medias de 8,35, 8,08 y 8,63 respectivamente. Las temperaturas medias del agua de estos hábitats fueron de

22,97°C, 24,19°C y 25,1°C respectivamente. El mayor número de hábitats compartido (AAE) se encontró en las categorías recipientes plásticos, recipientes de vidrio y de caucho (Tabla 3).

Tabla 3. Abundancia de inmaduros de *Aedes aegypti*, *Ae. albopictus* y otros culícidos por tipo de hábitat y variables físico químicas.

Tipo de hábitat	Abundancia media de <i>Ae. aegypti</i>	Abundancia media de <i>Ae. albopictus</i>	Abundancia media de otros Culicidae	pH	Temp. ° C	AA	A E	AAE
Chatarra	36.05 (43.52)	1.74 (2.47)	2 (4.82)	8.14 (1.54)	21.94 (4.91)	0	10	9
Lona	35.67 (61.71)	2.67 (5.43)	22.00 (40.93)	8.31 (1.46)	23.29 (3.67)	0	11	13
Caucho	25.43 (34.6)	1.38 (4.38)	8.85 (26.4)	8.35 (1.66)	22.97 (5.9)	10	158	56
Otros	59.33 (44.32)	20.67 (37.49)	11 (17.39)	7.68 (0.94)	23.75 (1.96)	0	2	4
cemento	27.69 (33.86)	6.34 (13.02)	1.25 (4.41)	7.25 (1.34)	23.63 (3.99)	0	9	22
cerámica	11.1 (11.83)	4.86 (12.82)	1.24 (3.66)	8.11 (1.14)	23.95 (4.38)	1	9	10
metal	41.12 (64.25)	11.44 (21.46)	4.29 (13.04)	7.93 (1.31)	24.4 (3.77)	2	11	21
natural	1.98 (3.41)	2.31 (3.75)	0.24 (0.62)	5.42 (1.35)	23.23 (2.39)	21	14	7
plástico	29.6 (44.78)	4.53 (12.21)	5.7 (19.69)	8.08 (1.51)	24.19 (4.74)	4	126	100
vidrio	18.11 (28.51)	5.14 (12.52)	1.64 (5.95)	8.63 (1.71)	25.1 (4.25)	5	79	67
Tanque de agua	28.6 (32.0)	1.07 (3.86)	14.73 (21.39)	7.36 (0.65)	23.63 (3.58)	0	13	2

AA: N° de hábitats con *Aedes albopictus* sin *aegypti*; AE: N° de hábitats con *Ae. aegypti* sin *albopictus*; AAE: N° de hábitats con *Ae. albopictus* y *Ae. aegypti*; (): desvío standart

Análisis considerando cada tipo de hábitat en función de las categorías AA, AE y AAE.

Del total de colectas realizadas en recipientes naturales, *Ae. albopictus* sin *Ae. aegypti* (AA) fue hallado en el 50% de los hábitats naturales; mientras que *Ae. aegypti* sin *Ae. albopictus* se colectó en el 71% de los recipientes de caucho (neumáticos) y 87% de los tanques de agua (AA) inspeccionados. Por otro lado si bien en todas las categorías se hallaron en simpatría (AAE), en lonas, “otros”, cemento y metal fueron halladas en porcentajes superiores al 50% de los recipientes inspeccionados para las respectivas categorías (Tabla 4).

Tabla 4. Frecuencia relativa de cada categoría de hábitat por tipo de recipiente.

Categoría de hábitat	natural	lona	caucho	plástico	chatarra	otros	vidrio	cemento	metal	tanque	total
AA	0,50	0	0,05	0,02	0	0	0,03	0,02	0,06	0	0,05
AAE	0,17	0,54	0,25	0,43	0,47	0,67	0,45	0,62	0,62	0,13	0,39
AE	0,33	0,46	0,71	0,55	0,53	0,33	0,52	0,37	0,32	0,87	0,55
Total	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

AA: N° de hábitats con *Aedes albopictus*; AE: N° de hábitats con *Ae. aegypti*; AAE: N° de hábitats con *Ae. albopictus* y *Ae. aegypti*

Análisis considerando todos los tipos de hábitats en función de las categorías AA, AE y AAE.

Del total de recipientes inspeccionados, *Ae. albopictus* sin *Ae. aegypti* se halló mayoritariamente en hábitats naturales (tocón principalmente) (49%) seguido por caucho (neumáticos) (Tabla 5). Los principales hábitats donde *Ae. aegypti* se colectó sin *Ae. albopictus* estuvieron representados por las categorías caucho (35%) y plástico (29%) (Tabla 5). Por último ambas especies habitando en simpatria, mayoritariamente se hallaron en plástico, seguido de vidrio y caucho (Tabla 5).

Tabla 5. Frecuencia relativa de tipo de hábitat por clasificación de recipiente.

Categoría de hábitat	natural	lona	caucho	plástico	chatarra	otros	vidrio	cemento	metal	tanque	total
AA	0,49	0	0,23	0,09	0	0	0,12	0,02	0,05	0	1
AAE	0,02	0,04	0,17	0,32	0,03	0,01	0,22	0,10	0,07	0,01	1
AE	0,03	0,03	0,35	0,29	0,02	0,0046	0,18	0,04	0,03	0,03	1
Total	0,05	0,03	0,27	0,29	0,02	0,01	0,19	0,07	0,04	0,02	1

AA: N° de hábitats con *Aedes albopictus*; AE: N° de hábitats con *Ae. aegypti*; AAE: N° de hábitats con *Ae. albopictus* y *Ae. aegypti*.

El análisis de correspondencia múltiple (ACM) permitió establecer que el 100 % de la inercia se explica con dos dimensiones, donde el primer eje representa el 78,25 % de la inercia, sugiriendo que *Ae. albopictus* criando sin *Ae. aegypti*, se halla relacionado principalmente con recipiente natural. En el segundo eje (con una inercia del 21,75%), *Ae. aegypti* sin *Ae. albopictus* se relaciona con los neumáticos y por último ambas especies en simpatria se asocian con una gran variedad de hábitats (vidrio, chatarra, plástico, lona, cemento, metal u otros) (Fig. 2).

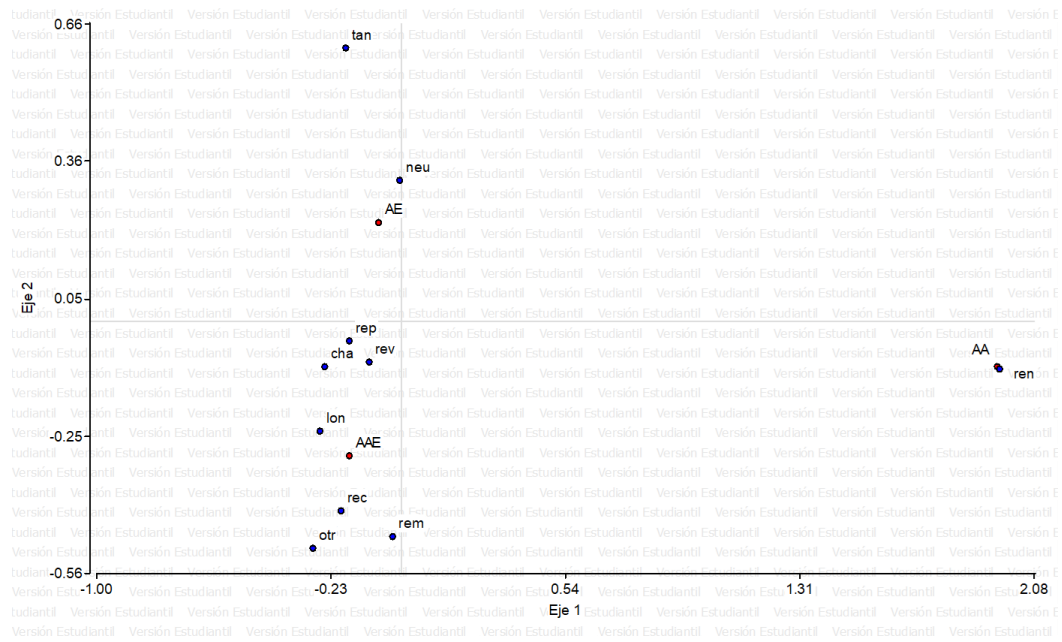


Figura 2. Gráfico de análisis de correspondencia múltiple de categorías de criaderos y tipo de recipiente. AA: hábitats con *Aedes albopictus*; AE: hábitats con *Ae. aegypti*; AAE: hábitats con *Ae. albopictus* y *Ae. aegypti*. tan: tanque de agua, neu: caucho, rep: plástico, rev: vidrio, cha: chatarra, lon: lona, rec: cemento, rem: metal, otr: otros (maceta, lanchas).

DISCUSIÓN

Los ambientes urbanos ofrecen una amplia variedad de microambientes artificiales factibles de convertirse en hábitats larvales de culícidos. Estos microambientes se hallan distribuidos en los domicilios, peri domicilios y espacios públicos (Grech & Ludueña-Almeida, 2016). Entre las especies de mosquitos que se desarrollan frecuentemente en este tipo de hábitats se encuentran *Ae. aegypti* y *Ae. albopictus*, hallados en el 63% de los recipientes colectados en la ciudad de Eldorado.

Dentro de las ciudades, los barrios con vegetación y sitios sombreados son hábitats favorables para *Ae. aegypti* (Vezzani *et al.* 2005). En el país y la región se ha encontrado *Ae. aegypti* habitando una gran variedad de recipientes domiciliarios, como botellas, latas, recipientes plásticos, lonas, electrodomésticos en desuso, tachos, baldes (Almirón & Ludueña-Almeida, 1998; Stein *et al.*, 2007; Garelli *et al.*, 2009).

Aedes albopictus en la provincia de Misiones ha sido registrado anteriormente en barrios de la ciudad de Eldorado por Schweigmann *et al.* (2004) en simpatría con *Ae. aegypti* en el 85 % de los recipientes colectados; entre ellos chatarra, juguetes de plástico y neumáticos en desuso en los patios de las viviendas. Para la ciudad de Puerto Iguazú fue encontrado en botellas, envases plásticos, electrodomésticos en desuso, neumáticos; en el 6,6 % de los casos en simpatría con *Ae. aegypti* y en el 2,6 % de los recipientes habitando solo (Espinosa *et al.*, 2007) . En coincidencia a estos reportes previos tanto para *Ae. aegypti* como para *Ae. albopictus*, en este trabajo se encontraron las mayores abundancias de larvas en los patios de las viviendas familiares, en una gran variedad de hábitats. Los hábitats más productivos, aunque menos abundantes para *Ae. aegypti* han sido una lancha abandonada, bolsas de polietileno y macetas; y los más abundantes los recipientes plásticos como hábitat de *Ae. aegypti* sin *Ae. albopictus*, como así también para ambas especies habitando en simpatría. El uso de recipientes plásticos en nuestra sociedad se encuentra muy extendido, con lo cual deberían ser tenidos en cuenta a la hora de implementar medidas de control.

A diferencia de lo observado en Clorinda, (Formosa) ciudad del noreste de Argentina, donde los tanques de agua utilizados para la acumulación de agua potable constituyen los hábitats más abundantes y productivos (Garelli *et al.*, 2009), los escasos encontrados en Eldorado fueron poco productivos y mayoritariamente con la presencia de *Ae. aegypti* sin *Ae. albopictus*.

Los cementerios son considerados dentro de las áreas urbanas uno de los principales focos de producción de mosquitos. Existen características asociadas a la calidad de estos sitios, entre ellas la vegetación utilizada para refugio y alimentación de adultos, la visita de humanos para que las hembras puedan alimentarse y la presencia de floreros con plantas (Schultz, 1989; Vezzani *et al.*, 2001; Barrera *et al.*, 2006; Vezzani, 2007). Los cementerios estudiados aquí presentan abundante vegetación con gran cantidad de recipientes de vidrio y cerámica utilizados como floreros, donde *Ae. aegypti* y *Ae. albopictus* se encontraron coexistiendo. Para *Ae. albopictus* las mayores abundancias habitando en simpatría con *Ae. aegypti*, se hallaron en jarrones de barro, que si bien no fueron importantes en cuanto al número, si en cuanto a la productividad, probablemente relacionado con las características del material que resultarían ventajosas, entre ellas su porosidad que permite a las hembras posar fácilmente y colocar sus huevos, y la capacidad del material de conservar la temperatura del agua fresca.

Los neumáticos descartados son hábitats muy productivos, almacenan cantidades de agua considerable, la evaporación es baja y la superficie es rugosa y oscura para facilitar la puesta de huevos (Thiratapsakun *et al.*, 1981; Suwonkerd *et al.*, 1996). En el norte de Florida (Estados Unidos), *Ae. albopictus*, es un competidor superior y la especie dominante en este tipo de hábitat (Juliano, 1998; Yee, 2008). A pesar de esta superioridad competitiva, ambas especies co-existen en la mayoría de los sitios dónde han sido halladas en simpatría en Brasil y en el sur de Florida (O'Meara *et al.* 1995; Juliano *et al.* 2002; Braks *et al.*, 2003; Rey *et al.*, 2006; Honório *et al.*, 2006) . En Eldorado, *Ae. aegypti* fue la especie dominante en los neumáticos, que si bien se lo ha encontrado en simpatría con *Ae. albopictus*, las abundancias de este último fueron muy bajas y la mayor parte de las veces no estuvo asociado a ese tipo de hábitat. En otras ciudades de Argentina donde sólo habita *Ae. aegypti*, los

neumáticos representan un hábitat importante para producción de formas inmaduras (Stein *et al.* 2002; Vezzani & Carbajo 2008; Rubio *et al.*, 2011). Una excepción se observa en Colonia Aurora, Misiones en donde de 18 cubiertas revisadas en ninguna se halló *Ae. aegypti*, pero en cambio fueron colectados ejemplares de *Ae. albopictus* y otros culícidos (Lizuain *et al.*, 2019). En un estudio experimental a campo, realizado con neumáticos como trampa, en un Municipio de Río de Janeiro, encuentran que *Ae. albopictus* fue más abundante que *Ae. aegypti* (Honório & Lourenço-de-Oliveira &, 2001).

En estudios realizados en México y Brasil, en ciudades donde ambas especies se encuentran en simpatría, se ha propuesto la segregación de hábitats, donde *Ae. aegypti* predomina en recipientes artificiales de áreas urbanas, y *Ae. albopictus* habita preferentemente recipientes naturales de áreas sub urbanas y rurales (Braks *et al.* 2003; Ponce *et al.*, 2004; Lima-Camara *et al.*, 2007; Honório *et al.*, 2009). En Argentina, la presencia de *Ae. albopictus* ha sido asociada en estudios previos en la ciudad de Puerto Iguazú a áreas periurbanas linderas a parches de vegetación y corredores selváticos (Espinosa *et al.*, 2007). En Colonia Aurora, considerada una localidad con características rurales, a diferencia de Eldorado caracterizada como urbana, ambas especies se hallan en similares proporciones (Lizuain *et al.*, 2019). El presente trabajo muestra similitud con lo descrito para Puerto Iguazú, ya que la mayor cantidad de hábitats de *Ae. albopictus* sin *Ae. aegypti* fueron tocones de tacuara en zonas periurbanas, coincidente además con estudios realizados en Recife, Brasil y en Caracas, Venezuela que destacan este tipo de hábitat para *Ae. albopictus* (Vélez *et al.*, 1998; De Albuquerque *et al.*, 2000; Zorrilla *et al.*, 2011). Como hallazgo de importancia también se ha encontrado tocones de tacuara habitados únicamente por *Ae. aegypti*, en el presente estudio. En Brasil otro tipo de hábitat natural importante son las bromelias (Delsio Natal *et al.*, 1997; De Albuquerque *et al.*, 2000), al contrario en Eldorado, no se encontraron larvas de *Ae. albopictus* en este tipo de hábitats durante el período de muestreo.

La temperatura óptima para el desarrollo de fases larvales de *Ae. aegypti* según Rueda *et al.* (1990) se encuentra entre 25-30°C. Para la provincia de Chaco, Stein *et al.* (2011) encontraron temperaturas entre 19-37°C; en el presente estudio la temperatura del agua donde se halló tanto *Ae. aegypti* como

Ae. albopictus se registró en un intervalo más amplio de 5,4-34,9°C, incluso a temperaturas superiores a las establecidas por Christophers (1960) para el desarrollo de *Ae. aegypti*.

El pH del agua del criadero tendría poco efecto sobre la supervivencia y la densidad de las larvas y pupas de *Ae. aegypti* y *Ae. albopictus* (Christophers, 1960; Alves Honório & Lourenço-de-Oliveira, 2001) y según Forattini (1965) las larvas mostrarían tolerancia a grandes variaciones en el pH. Los valores de pH encontrados en nuestro estudio desde ácidos a básicos, se encuentran en un intervalo mayor al reportado por Christophers (1960) para *Ae. aegypti* de entre 5,8 y 8,6. Para *Ae. albopictus*, Sehgal & Pillai (1970) reportaron una preferencia hacia un pH ligeramente alcalino de 7,5, en contraste aquí hallamos *Ae. albopictus* en hábitats con pH ácido. Un pH inferior a 5 o superior a 9 reduciría el porcentaje de emergencia y alargaría el período de desarrollo de la especie (Christophers, 1960).

Los resultados surgidos del presente estudio y de las escasas investigaciones realizadas hasta el presente sugieren que la distribución de las abundancias de *Ae. albopictus* en Argentina en relación a las de *Ae. aegypti* viviendo en simpatria, respondería en parte a la segregación de hábitats, donde la primera prefiere o selecciona ambientes naturales con escasa modificación antrópica (con mayor cobertura vegetal) y la segunda se adapta mejor a los ambientes urbanos. Su comportamiento podría relacionarse con su acervo génico y la plasticidad genética del haplotipo que ha colonizado esta región geográfica, que correspondería a poblaciones de origen tropical como la que colonizó Brasil (Hawley *et al.*, 1988; Birungi & Munstermann, 2002), algo que podría explorarse en futuras investigaciones.

Las razones de la limitada distribución de *Ae. albopictus* en Argentina a 20 años desde su descubrimiento en la provincia de Misiones, siguen siendo desconocidas, considerando la gran capacidad de dispersión demostrada en otras regiones del mundo e incluso en países limítrofes como Brasil. Podemos pensar que la cepa tropical de *Ae. albopictus* no sólo estaría limitada por las condiciones climáticas en Argentina sino también por las condiciones ambientales como sitios con mayor cobertura vegetal, sub-urbanos o silvestres muy representativos en la provincia de Misiones u otras con características

fitogeográficas similares pero menos representativos en la zona centro de Argentina.

En EEUU se sabe que su dispersión se ha debido al comercio interno de neumáticos usados (Hawley, 1988), siendo este tipo de hábitat uno de los más productivos para la especie, al igual que los floreros o vasos en los cementerios siendo que los recipientes domiciliarios son escasos y no representan importantes criaderos de la especie en áreas urbanas en ese país (O'Meara, *et al.*, 1995). En Brasil se cree que su dispersión fue por la red ferroviaria (Carvalho *et al.*, 2014). Zanotti *et al.* (2015) mencionan el comercio de neumáticos como una de las posibles vías de dispersión de *Ae. aegypti* hacia diferentes localidades costeras de la provincia de Buenos Aires y es posible que haya sido la principal en Argentina, por lo que los resultados del presente estudio podrían hacernos pensar en cuanto a las bajas abundancias de *Ae. albopictus* en neumáticos podrían también estar limitando la dispersión de la especie hacia otras localidades. Debido a que el principal método utilizado por los Municipios en Argentina, para la vigilancia de mosquitos *Aedes* es la metodología LIRA basada en la colecta de 10 larvas en criaderos artificiales dentro de los domicilios, y considerando que los resultados del presente estudio arrojan bajas proporciones de *Ae. albopictus* en relación a *Ae. aegypti* en los distintos tipos de criaderos (4/10) es posible que su detección en otras localidades puede estar siendo subestimada.

BIBLIOGRAFÍA

Almirón, W. R., & Ludueña-Almeida, F. F. . (1998). *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) en Córdoba, Argentina, 57(1–4), 27–28.

Barrera, R., Amador, M., & Clark, G. G. (2006). Ecological factors influencing *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) productivity in artificial containers in Salinas, Puerto Rico. *Journal of Medical Entomology*, 43(3), 484–492. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16739405>

Bentley, M. D., & Day, J. F. (1989). CHEMICAL ECOLOGY AND BEHAVIORAL ASPECTS OF MOSQUITO OVIPOSITION Further ANNUAL REVIEWS. *Ann. Rev. Entomol*, 34, 401–422. Retrieved from www.annualreviews.org

Birungi, J., & Munstermann, L. E. (2002). Genetic Structure of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) Populations Based on Mitochondrial ND5 Sequences: Evidence for an Independent Invasion into Brazil and United States. *Annals of the Entomological Society of America*, 95(1), 125–132. [https://doi.org/10.1603/0013-8746\(2002\)095\[0125:gsoaad\]2.0.co;2](https://doi.org/10.1603/0013-8746(2002)095[0125:gsoaad]2.0.co;2)

Braks, M. A. H., Honório, N. A., Lourenço-De-Oliveira, R., Juliano, S. A., & Lounibos, L. P. (2003). Convergent Habitat Segregation of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in Southeastern Brazil and Florida. *Journal of Medical Entomology*, 40(6), 785–794. <https://doi.org/10.1603/0022-2585-40.6.785>

Campos, R. E., G, S., & Mogi, M. (2011). Culicidae and Ceratopogonidae (Diptera: Nematocera) inhabiting phytotelmata in Iguazú National Park, Misiones Province, subtropical Argentina. *Rev. Soc. Entomol. Argent*, 70, 111–118.

Carvalho, R. G., Lourenço-De-Oliveira, R., & Braga, I. A. (2014). Updating the geographical distribution and frequency of *Aedes albopictus* in Brazil with remarks regarding its range in the Americas. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 109(6), 787–796. <https://doi.org/10.1590/0074-0276140304>

Christophers, S. R. (1960). *Aedes aegypti* L. *The yellow fever mosquito: its life history, bionomics and structure*. (C. U. Press, Ed.). <https://doi.org/10.1007/3-540-30802-4>

- Day, J. F. (2016). Mosquito oviposition behavior and vector control. *Insects*, 7(4), 1–22. <https://doi.org/10.3390/insects7040065>
- De Albuquerque, C. M. R., Melo-Santos, M. A. V., Bezerra, M. A. S., Barbosa, R. M. R., Silva, D. F., & Silva, E. Da. (2000). Primeiro registro de *Aedes albopictus* em área da Mata Atlântica, Recife, PE, Brasil. *Revista de Saude Publica*, 34(3), 314–315.
- Delsio, N., Urbinatti, P.R., Taípe-Lagos, C. B., Cereti-Júnior W., Diederichsen, A. T. B., Souza R. G. & Souza, R. P. (1997). Encontro de *Aedes* (*Stegomyia*) *albopictus* (Skuse) em Bromeliaceae na periferia de São Paulo, SP, Brasil. *Rev. Saúde Pública*, 31 (5): 517-8.
- Espinosa, M., D, W., A., G., & M, A. (2007). Primer registro de *Aedes albopictus* (Skuse) (Diptera: Culicidae) en la ciudad de Puerto Iguazú, Misiones, Argentina. *Revista Argentina de Zoonosis y Enfermedades Infecciosas Emergentes*, 24–26.
- Foratini, O.P. 1965. *Entomologia Médica. Volumen II: Culicini: Culex, Aedes e Psorophora*. Sao Paulo, 416 pp.
- Garelli, F., MO, E., Weinberg, D., HD, C., Gaspe, M., & RE, G. (2009). Patterns of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) Infestation and Container Productivity Measured Using Pupal and *Stegomyia* Indices in Northern Argentina, 46(5), 1176–1186. <https://doi.org/10.1039/b800799c>
- Gloria-Soria, A., Ayala, D., Bheecarry, A., Calderon-Arguedas, O., Chadee, D. D., Chiappero, M., ... Powell, J. R. (2016). Global genetic diversity of *Aedes aegypti*. *Molecular Ecology*, 25(21), 5377–5395. <https://doi.org/10.1111/mec.13866>
- Grech, M. G. & Ludueña-Almeida, F F. (2016). Mosquitos que crían en microambientes artificiales abundantes. In N. S. C Beron, R Campos, R Gleiser, L Diaz Nieto, O Salomon (Ed.), *Investigaciones sobre mosquitos de Argentina* (pp. 142–155).
- Hawley, W. A., Reiter, P., Copeland, R. ., Pumpuni, C., & Craig, G. (1988). *Aedes albopictus* in North America: probable introduction in used tires from northern Asia. *Science*, 236(4805), 1114–1116. <https://doi.org/10.1126/science.3576225>

- Honório, N., & Lourenço-de-Oliveira, R. (2001). Freqüência de larvas e pupas de *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* em armadilhas, Brasil. *Revista de Saúde Pública*, 35(4), 385–391. <https://doi.org/10.1590/s0034-89102001000400009>
- Honório, N. A. ., Cabello, P. H. ., Codeço, C. T. ., & Lourenço-de-Oliveira, R. (2006). Preliminary data on the performance of *Aedes albopictus* immatures developing in water-field tires in Rio de Janeiro. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 101(2), 225–228. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762006000200017>
- Juliano. (1998). Species Introduction and Replacement among Mosquitoes: Interspecific Resource Competition or Apparent Competition ?. *Ecology*, 79(1), 255–268.
- Juliano, S. A., O'Meara, G. F., Morrill, J. R., & Cutwa, M. M. (2002). Desiccation and thermal tolerance of eggs and the coexistence of competing mosquitoes. *Oecologia*, 130(3), 458–469. <https://doi.org/10.1007/s004420100811>
- Lima-Camara, T. N. de, Honório, N. A., & Lourenço-de-Oliveira, R. (2007). Freqüência e distribuição espacial de *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* (Diptera, Culicidae) no Rio de Janeiro, Brasil. *Cadernos de Saúde Pública*, 22(10), 2079–2084. <https://doi.org/10.1590/s0102-311x2006001000013>
- Lizuain, A. A. ., Leporace, M., Santini, M. S., & Schweigmann, N. (2016). Presencia y abundancia relativa de *Aedes albopictus* y *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) según dimensiones de recipiente de cría en dos municipios de la provincia de Misiones, Argentina Arturo. In C. Berón & L. D.-N. Instituto (Eds.), X Jornadas Regionales sobre Mosquitos (p. 53). Mar del Plata.
- Lizuain, A. A. ., Leporace, M., Santini, M., Utgés, M., & Schweigmann, N. (2019). Update on the distribution of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in Misiones, Argentina. *Revista Do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*, 61(e:46), 1–6. <https://doi.org/10.1177/016555157900100507>
- Mangudo, C., Aparicio, J. P., & Gleiser, R. M. 2010. Huecos de árboles como hábitat larval de *Aedes aegypti* en el arbolado público de la localidad de Aguarray, provincia de Salta, VII Jornadas Regionales sobre mosquitos, Universidad Nacional de Misiones, Posadas, pp. 37.
- Nildimar Alves Honório e Ricardo Lourenço-de-Oliveira, & Alves, N. (2001).

Freqüência de larvas e pupas de *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* em armadilhas, Brasil *. *Rev Saúde Pública*, 35(4), 385–391.

O'Meara, G. F., Evans Leonard F., J., Gettman, A. D., & Cuda, J. P. (1995). Spread of *Aedes albopictus* and decline of *Ae. aegypti* (Diptera: Culicidae) in Florida. *Journal of Medical Entomology*, 32(4), 554–562. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1093/jmedent/32.4.554>

Ponce, G., Flores, A. E., Badii, M. H., & Fernández, I. (2004). Bionomía de *Aedes albopictus* (Skuse). *Revista Salud Publica y Nutrición*, 5(12), 17.

Rey, J. R. ., Nishimura, N., Wagner, B., Braks, M. A. H. ., O'Connell, S. M. ., & Lounibos, L. P. (2006). Habitat Segregation of Mosquito Arbovirus Vectors in South Florida. *J. Med. Entomol.*, 43(6), 1143–1141. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0178059>

Rossi, G. C., Pascual, N. T., & Krsticevic, F. J. (1999). First record of *Aedes albopictus* (Skuse) from Argentina. *Journal of the American Mosquito Control Association*.

Rossi, G. C. ., & Almiron WR. (2004). Clave ilustrada para la identificación de larvas de mosquitos de interés sanitario encontradas en criaderos artificiales en la Argentina Rossi, (Vol. 16). <https://doi.org/10.1177/0897190003257626>

Rubio, A., Cardo, M. V., & Vezzani, D. (2011). Tire-breeding mosquitoes of public health importance along an urbanisation gradient in Buenos Aires, Argentina. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 106(6), 678–684. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762011000600006>

Rueda, L. M., Patel, K. J., Axtell, R. C., & Stinner, R. E. (1990). Temperature-dependent development and survival rates of *Culex quinquefasciatus* and *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Journal of Medical Entomology*, 27(5), 892–898. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2231624>

Schultz, G. W. (1989). Cemetery vase breeding of dengue vectors in Manila. Republic of the Philippines. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 5(4), 508–513.

Schweigmann, N., Vezzani, D., Orellano, P., Kuruc, J., & Boffi, R. (2004). *Aedes*

albopictus in an area of Misiones, Argentina. *Revista de Saude Publica*, 38(1), 136–138. <https://doi.org/10.1590/S0034-8910200400010002>

Sehgal, S. S. ., & K., P. M. K. (1970). Preliminary studies on the chemical nature of Mosquito-Breeding Waters in Delhi. *Bull WHO*, 42, 647–650.

Stein, M., Oria, G., & Almirón, W. (2002). Main breeding-containers for *Aedes aegypti* and associated culicids, Argentina. *Revista de Saude Publica*, 36(5), 627–630. <https://doi.org/10.1590/S0034-89102002000600013>

Stein, M., Almirón, W. R., F, L. A., Zapata, L., Mari, E., & Gorodner, J. O. (2007). *Aedes aegypti* y culícidos asociados (Diptera: Culicidae) en la ciudad de Corrientes, Argentina. www.Siicsalud.Com/Dato/Dat051/06d28002.Htm. Stein, (6), 52–58. Retrieved from www.siicsalud.com/dato/dat051/06d28002.htm.%0AStein

Stein, M., Ludueña-Almeida, F., Willener, J. A., & Ricardo Almirón, W. (2011). Classification of immature mosquito species according to characteristics of the larval habitat in the subtropical province of Chaco, Argentina. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 106(4), 400–407. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762011000400004>

Stein, M., Juri, M. J. D., Oria, G. I., & Ramirez, P. G. (2013). *Aechmea distichantha* (Bromeliaceae) Epiphytes, Potential New Habitat for *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) Collected in the Province of Tucumán, Northwestern Argentina . *Florida Entomologist*, 96(3), 1202–1206. <https://doi.org/10.1653/024.096.0368>

Stein, M., Rossi, G. C. & Almirón, W. R. (2016). Distribucion geográfica de Culicidae de Argentina. In N. S. C Beron, R Campos, R Gleiser, L Diaz Nieto, O Salomon (Ed.), *Investigaciones sobre mosquitos de Argentina* (pp. 47–56).

Suwonkerd W, Tsuda Y, Takagi M, Wada Y. Seasonal occurrence of *Aedes albopictus* in used tires in 1992- 1994, Chiangmai, Thailand. *Trop Med* 1996;38:101-5.

Thiratapsakun, L. Tauthong, P. & Phanthuinachinda, B. (1981). Surface preferences for oviposition of *Aedes aegypti* in Thailand. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*. 12: 209-212

Vélez, I. D., Quiñones, M. L., Suarez, M., Olano, V., Murcia, L. M., Correa, E., ... Morales, A. (1998). Presencia de *Aedes albopictus* en Leticia, Amazonas, Colombia. *Biomédica*, 18(3), 192–198.

Vezzani, D., Velázquez, S. M., Soto, S., & Schweigmann, N. J. (2001). Environmental Characteristics of the Cemeteries of Buenos Aires City (Argentina) and Infestation Levels of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 96(4), 467–471. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762001000400005>

Vezzani, D., & Schweigmann, N. (2002). Suitability of containers from different sources as breeding sites of *Aedes aegypti* (L.) in a cemetery of Buenos Aires City, Argentina. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 97(6), 789–792. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762002000600006>

Vezzani, D., Rubio, A., Velázquez, S. M., Schweigmann, N., & Wiegand, T. (2005). Detailed assessment of microhabitat suitability for *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) in Buenos Aires, Argentina. *Acta Tropica*, 95(2), 123–131. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2005.03.010>

Vezzani, D. (2007). Review: Artificial container-breeding mosquitoes and cemeteries: A perfect match. *Tropical Medicine and International Health*, 12(2), 299–313. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3156.2006.01781.x>

Vezzani, D., & Carbajo, A. E. (2008). *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus*, and dengue in Argentina: Current knowledge and future directions. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 103(1), 66–74. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762008005000003>

Waldock, J., Chandra, N. L., Lelieveld, J., Proestos, Y., Michael, E., Christophides, G., & Parham, P. E. (2013). The role of environmental variables on *Aedes albopictus* biology and chikungunya epidemiology . *Pathogens and Global Health*, 107(5), 224–241. <https://doi.org/10.1179/2047773213y.0000000100>

Yee, D. A. (2008). Tires as habitats for mosquitoes: a review of studies within the eastern United States. *Journal of Medical Entomology*, 45(4), 581–593. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18714856>

Yee, D. A., M, K. J., & Juliano, S. A. (2010). Environmental Correlates of Abundances of Mosquito Species and Stages in Discarded Vehicle Tires, 47(1), 53–62. <https://doi.org/10.1039/b800799c.O>

Zanotti, G., De Majo, M. S., Alem, I., Schweigmann, N., Campos, R. E., & Fischer, S. (2015). New records of *Aedes aegypti* at the southern limit of its distribution in Buenos Aires province, Argentina. *Journal of Vector Ecology*, 40(2), 408–411. <https://doi.org/10.1111/jvec.12181>

Zorrilla, A., Quintero, L., Del Ventura, F., Muñoz, M., Moncada, N., & Navarro, J. C. (2011). Aspectos ecológicos de *Aedes albopictus* (Skuse, 1894) en Caracas, Venezuela Ecological notes of *Aedes albopictus* (Skuse, 1894) in Caracas city, Venezuela. *Boletín de Malariología y Salud Ambiental*, 51(2), 229–235. Retrieved from <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-83255164791&partnerID=40&md5=ee2556d072c5e29f3151a1ea92e4494b>

SECCIÓN II

Patógenos de mosquitos (Diptera: Culicidae) de
importancia sanitaria

INTRODUCCIÓN

Microorganismos patógenos encontrados en larvas de *Aedes aegypti* (Linnaeus) y *Ae. albopictus* (Skuse) (Diptera: Culicidae)

Hongos

Las enfermedades fúngicas en insectos son comunes, incluso pueden producir epizootias disminuyendo drásticamente los tamaños poblacionales (Scholte *et al.*, 2004). Entre los hongos encontrados en estudios de campo en *Aedes* spp. se encuentra *Leptolegnia chapmanii* (Seymour, 1984), taxonómicamente clasificada dentro de los Peronosporomycetes (Oomycetes) en el reino Straminipila. Presenta un ciclo de vida que abarca el desarrollo vegetativo al interior de la larva y el posterior desarrollo de estructuras infectivas asexuales (zoosporas) y sexuales (oosporas). Las zoosporas infectan a las larvas por dos mecanismos, enquistamiento de zoosporas móviles en la cutícula larval o por germinación de quistes de zoosporas en el intestino del huésped, luego de ingeridos. Externamente, cuando las zoosporas se adhieren a la cutícula, se desarrolla un tubo germinativo que la atraviesa hasta llegar a la cavidad hemocélica. Desde el interior de la larva, el mismo proceso se presenta con las zoosporas primarias o secundarias enquistadas que han sido ingeridas. En ambos casos, se presenta el desarrollo de las hifas en la cavidad, siendo mortal para la larva. Durante las 12 primeras horas del desarrollo del hongo, las larvas continúan vivas, presentando melanización de las hifas así como de tejidos circundantes, como respuesta ante la infección. Una vez que *L. chapmanii* invade la totalidad del cuerpo, se desarrollan hifas que emergen y forman zoosporangios en donde se originan las zoosporas primarias (Seymour, 1984) (Fig. 1). Las zoosporas descargadas suelen enquistarse luego de algunos minutos, re-emergiendo luego de algunas horas, como zoosporas secundarias, las cuales nadan activamente en busca de nuevas larvas que infectar (Zattau & McInnis, 1987; Pelizza *et al.*, 2008). Es un patógeno virulento de *Ae. aegypti*, causando un 100% de mortalidad luego de 24 hs de exposición en larvas de primer y segundo estadio (Scholte *et al.*, 2004). Se lo ha encontrado infectando larvas naturalmente en distintos hábitats naturales y artificiales (Gutiérrez *et al.*, 2017). En Brasil se lo ha registrado por primera vez en el estado de Goiás, utilizando larvas de *Ae. aegypti* como cebo en campo (Montalva *et al.*, 2016). En

Argentina se reportó por primera vez un aislado nativo de *L. chapmanii* (ARSEF 5499) produciendo un evento epizoótico en una población natural del mosquito *Ochlerotatus albifasciatus* (Macquart) cerca de la ciudad de La Plata, Argentina, en 1996 (López Lastra *et al.*, 1999).

Para *Ae. albopictus*, Fukuda *et al.* (1997) en Florida, EE. UU. observaron dos parásitos fúngicos, *L. chapmanii* y *Smittium culisetae* Lichwardt.

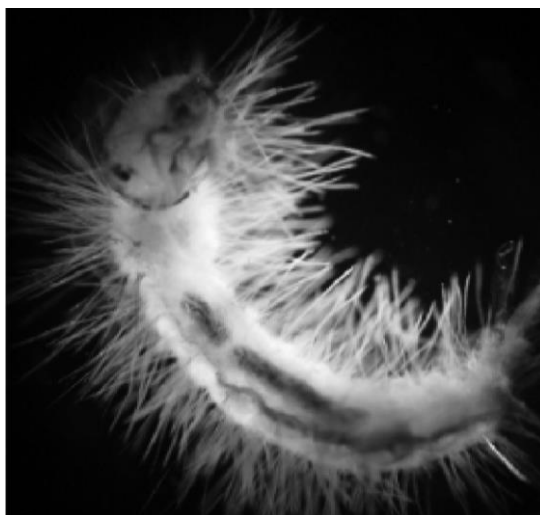


Figura 1. *Leptolegnia chapmanii* infectando una larva de *Aedes aegypti*. Tomado de Montalva *et al.* (2016).

Microsporidios

Los microsporidios pertenecen al Reino Fungi, Filo Microspora. Constituyen un grupo diverso de parásitos obligados intracelulares. Como parte de su ciclo de vida se encuentran las esporas, que pueden vivir fuera de la célula hospedadora y son los protagonistas principales para la transmisión horizontal y vertical (Andreadis, 2007). Entre los microsporidios más comunes que infectan larvas de *Ae. albopictus* y *Ae. aegypti* se encuentran *Vavraia culicis* (Weiser) y *Edhazardia aedis* (Kudo). Las infecciones se manifiestan como masas blancas opacas en los segmentos abdominales cuarto y quinto, allí se hallan las esporas (Fukuda *et al.*, 1997; Andreadis, 2007) (Fig. 2). En EE. UU. se encontraron larvas de *Ae. aegypti* y *Ae. albopictus* infectadas con *V. culicis* en neumáticos (Fukuda *et al.*, 1997; Becnel, 2007). *Edhazardia aedis* (Kudo) es específico de *Ae. aegypti*, presenta un ciclo de vida complejo que involucra la transmisión vertical y horizontal, con cuatro tipos de esporas diferentes producidas por el mosquito

(Becnel & Johnson, 2000; Desjardins *et al.*, 2015). Hasta el presente en Argentina no hay registros de microsporidios hallados en estas dos especies de *Aedes*, existiendo no obstante investigaciones de microsporidios en otros culícidos (Micieli *et al.*, 2000; Micieli *et al.*, 2007).



Figura 2. Larva de *Aedes aegypti* infectada con *Edhazardia aedis*, se observan las protuberancias blancas. Tomado de Desjardins *et al.* (2015).

Gregarinas

Ascogregarina taiwanensis (Lien y Levine) es el parásito más común de *Ae. albopictus* (Fukuda *et al.*, 1997) y *A. culicis* (Ross) infecta a *Ae. aegypti* (Sulaiman 1992). Externamente no se produce ningún cambio morfológico en las larvas infectadas. Este grupo de parásitos es desarrollado en el capítulo 3.

Virus

Los virus entomopatógenos que infectan mosquitos pertenecen a cuatro grandes grupos: Baculovirus, virus de la polihedrosis citoplasmática, densovirus y los iridovirus. Como característica morfológica asociada a la infección se observa en el núcleo (baculovirus) o citoplasma (virus de la polihedrosis citoplasmática) de las células del intestino medio una acumulación de cuerpos de oclusión de color blanquecino o iridiscente (Becnel & White, 2007). En el caso de los iridovirus, la infección patente se evidencia por el color iridiscente de los estados inmaduros, con diferentes tonalidades (verde, turquesa y mezcla de ambas) fácilmente observable bajo microscopio estereoscópico (Muttis *et al.*, 2012) (Fig. 3).

Los virus aislados para *Ae. aegypti* y *Ae. albopictus* se encuentran dentro del grupo de los densovirus, se cree que se mantienen en la naturaleza principalmente por transmisión horizontal, aunque se han registrado también transmisiones transovárica y venérea (Kittayapong *et al.*, 1999). Los densovirus fueron aislados de larvas en la naturaleza y colonias de *Ae. aegypti* y de colonias y una línea celular de *Ae. albopictus* (Afanasiev *et al.*, 1991; Jousset *et al.*, 1993; Kittayapong *et al.*, 1999). En Argentina se han publicado trabajos de detección de cepas virales (flavivirus específicos de insectos e iridovirus) a partir de *Culex* spp. (Goenaga *et al.*, 2014; Muttis *et al.*, 2012; Muttis *et al.*, 2013).



Figura 3. Larvas de *Culex pipiens* infectadas con virus iridiscente. Tomado de Muttis, 2017.

Bacterias

En los últimos años se ha abordado el concepto de “core microbiota” en mosquitos para referirse a la comunidad bacteriana con mayores valores de prevalencia, asociada a un huésped determinado, por ejemplo un género o una especie (David *et al.*, 2016; Guégan *et al.*, 2018; Rosso *et al.*, 2018). Para *Ae. aegypti* y *Ae. albopictus* se han identificado bacterias dentro de 4 Phyla principales: Proteobacteria, Firmicutes, Bacteroidetes y Actinobacteria (Zouache *et al.*, 2011; Moro *et al.*, 2013; Dada *et al.*, 2014; Yadav *et al.*, 2015; Chandel *et al.*, 2013).

En el presente trabajo dentro del grupo de las bacterias el interés se ha centrado en la detección de *Wolbachia*, la cual afecta principalmente las gónadas de sus hospedadores, provocando alteraciones en la reproducción además de efectos indirectos que interfieren en la replicación y diseminación de patógenos, modificando la capacidad de vector del mosquito (Moreira *et al.*, 2009).

BIBLIOGRAFIA

Afanasiev, B. N., Galyov, E. E., Buchatsky, L. P., & Kozlov, Y. V. (1991). Nucleotide sequence and genomic organization of *Aedes Densonucleosis* Virus. *Virology*, 185(1), 323–336. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(91\)90780-F](https://doi.org/10.1016/0042-6822(91)90780-F)

Andreadis, T. G. (2007). Microsporidian Parasites of Mosquitoes. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 23(sp2), 3–29. [https://doi.org/10.2987/8756-971x\(2007\)23\[3:mpom\]2.0.co;2](https://doi.org/10.2987/8756-971x(2007)23[3:mpom]2.0.co;2)

Becnel, J. J. (2007). *Vavraia culicis* (Weiser , 1947) Weiser , 1977 revisited : cytological characterisation of a *Vavraia culicis* -like microsporidium isolated from mosquitoes in Florida and the establishment of *Vavraia culicis floridensis subsp.* (Table 1), 259–271.

Becnel, J. J., & Johnson, M. A. (2000). Impact of *Edhazardia aedis* (Microsporidia: Culicosporidae) on a seminatural population of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Biological Control*, 18(1), 39–48. <https://doi.org/10.1006/bcon.1999.0805>

Becnel, J. J., & White, S. E. (2007). Mosquito pathogenic viruses--the last 20 years. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 23(2 Suppl), 36–49. [https://doi.org/10.2987/8756-971X\(2007\)23\[36:MPVLY\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.2987/8756-971X(2007)23[36:MPVLY]2.0.CO;2)

Chandel, K., Mendki, M. J., Parikh, R. Y., Kulkarni, G., Tikar, S. N., Sukumaran, D., ... Veer, V. (2013). Midgut microbial community of *Culex quinquefasciatus* mosquito populations from India. *PLoS ONE*, 8(11), 1–10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0080453>

Dada, N., Jumas-Bilak, E., Manguin, S., Seidu, R., Stenström, T. A., & Overgaard, H. J. (2014). Comparative assessment of the bacterial communities associated with *Aedes aegypti* larvae and water from domestic water storage containers. *Parasites and Vectors*, 7(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-7-391>

David, M. R., Barbosa dos Santos, L. M., Paulo Vicente, A. C., & Maciel-de-freitas, R. (2016). Effects of environment , dietary regime and ageing on the dengue vector microbiota : evidence of a core microbiota throughout *Aedes aegypti* lifespan. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 111(September), 577–587. <https://doi.org/10.1590/0074-02760160238>

Desjardins, C. A., Sanscrainte, N. D., Goldberg, J. M., Heiman, D., Young, S., Zeng, Q., ... Cuomo, C. A. (2015). Contrasting host-pathogen interactions and genome evolution in two generalist and specialist microsporidian pathogens of mosquitoes. *Nature Communications*, 6(May), 1–12. <https://doi.org/10.1038/ncomms8121>

Fukuda, T., Willis, O. R., & Barnard, D. R. (1997). Parasites of the Asian Tiger Mosquito and Other Container-Inhabiting Mosquitoes (Diptera: Culicidae) in Northcentral Florida. *Journal of Medical Entomology*. <https://doi.org/10.1093/jmedent/34.2.226>

Goenaga, S., Fabbri, C. M., García, J. B., Rondán, J. C., Gardenal, N., Calderón, G. E., ... Levis, S. M. C. (2014). New Strains of *Culex flavivirus* Isolated in Argentina. *Journal of Medical Entomology*, 51(4), 900–906. <https://doi.org/10.1603/me13172>

Guégan, M., Zouache, K., Démichel, C., Minard, G., Tran Van, V., Potier, P., ... Valiente Moro, C. (2018). The mosquito holobiont: fresh insight into mosquito-microbiota interactions. *Microbiome*, 6(1), 49. <https://doi.org/10.1186/s40168-018-0435-2>

Gutierrez, A. C., Rueda Páramo, M. E., Falvo, M. L., López Lastra, C. C., & García, J. J. (2017). *Leptolegnia chapmanii* (Straminipila: Peronosporomycetes) as a future biorational tool for the control of *Aedes aegypti* (L.). *Acta Tropica*, 169, 112–118. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2017.01.021>

Jousset, F. X., Barreau, C., Boublik, Y., & Cornet, M. (1993). A Parvo-like virus persistently infecting a C6/36 clone of *Aedes albopictus* mosquito cell line and pathogenic for *Aedes aegypti* larvae. *Virus Research*, 29, 99–114.

Kittayapong, P., Baisley, K. J., & O'Neill, S. L. (1999). A mosquito densovirus infecting *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* from Thailand. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 61(4), 612–617. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1999.61.612>

López Lastra, C. C., Steciow, M. M., & García, J. J. (1999). Registro más austral del hongo *Leptolegnia chapmanii* (Oomycetes: Saprolegniales) como patógeno de larvas de mosquitos (Diptera: Culicidae). *Revista Iberoamericana de Micología*, 16, 143–145.

Mieli, M. V., Marti, G. A., García, J. J., Tranchida, M. C., & Becnel, J. J. (2007). Epizootiological studies of *Amblyospora camposi* (Microsporidia: Amblyosporidae) in *Culex renatoi* (Diptera: Culicidae) and *Paracyclops fimbriatus fimbriatus* (Copepoda: Cyclopidae) in a bromeliad habitat. *Journal of Invertebrate Pathology*, 94(1), 31–37. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2006.08.004>

Mieli, M. V., Garcia, J. J., & Becnel, J. J. (2000). Life Cycle and Description of *Amblyospora camposi* n. sp. (Microsporidia: Amblyosporidae) in the Mosquito *Culex renatoi* (Diptera, Culicidae) and the Copepod *Paracyclops jimbrriatus jimbrriatus* (Copepoda, Cyclopidae), 47, 575–580.

Montalva, C., dos Santos, K., Collier, K., Rocha, L. F. N., Fernandes, É. K. K., Castrillo, L. A., ... Humber, R. A. (2016). First report of *Leptolegnia chapmanii* (Peronosporomycetes: Saprolegniales) affecting mosquitoes in central Brazil. *Journal of Invertebrate Pathology*, 136, 109–116. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2016.03.012>

Moreira, L. A., Iturbe-Ormaetxe, I., Jeffery, J. A., Lu, G., Pyke, A. T., Hedges, L. M., ... O'Neill, S. L. (2009). A *Wolbachia* Symbiont in *Aedes aegypti* Limits

Infection with Dengue, Chikungunya, and Plasmodium. *Cell*, 139(7), 1268–1278.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.11.042>

Moro, V. C., Tran, F. H., Nantenaina Raharimalala, F., Ravelonandro, P., & Mavingui, P. (2013). Diversity of culturable bacteria including *Pantoea* in wild mosquito *Aedes albopictus*. *BMC Microbiology*, 13(1).
<https://doi.org/10.1186/1471-2180-13-70>

Muttis, E., Miele, S. A. B., Belaich, M. N., Micieli, M. V., Becnel, J. J., Ghiringhelli Pablo D, & García, J. J. (2012). First record of a mosquito iridescent virus in *Culex pipiens* L. (Diptera: Culicidae). *Arch Virol*, 157, 1569–1571.
<https://doi.org/10.1007/s00705-012-1302-2>

Muttis, E., Micieli, M. V., & García, J. J. (2013). *Culex pipiens* affected by joint infection of a mosquito iridescent virus and *Strelkovimermis spiculatus*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 114(3), 295–297.
<https://doi.org/10.1016/j.jip.2013.08.010>

Pelizza, S. A., López Lastra, C. C., Becnel, J. J., Humber, R. A., & García, J. J. (2008). Further research on the production, longevity and infectivity of the zoospores of *Leptolegnia chapmanii* Seymour (Oomycota: Peronosporomycetes). *Journal of Invertebrate Pathology*, 98(3), 314–319.
<https://doi.org/10.1016/j.jip.2008.04.006>

Rosso, F., Tagliapietra, V., Albanese, D., Pindo, M., Baldacchino, F., Arnoldi, D., ... Rizzoli, A. (2018). Reduced diversity of gut microbiota in two *Aedes* mosquitoes species in areas of recent invasion. *Scientific Reports*, (June), 1–11.
<https://doi.org/10.1038/s41598-018-34640-z>

Scholte, E.-J., Knols, B. G. J., Samson, R. A., & Takken, W. (2004). Entomopathogenic fungi for mosquito control: A review. *Journal of Insect Science*, 4(19), 1–24. <https://doi.org/10.1673/031.004.1901>

Seymour, R. L. (1984). *Leptolegnia chapmanii* , an Oomycete Pathogen of Mosquito Larvae. *Mycologia*, 76(4), 670–674.

Sulaiman, I. (1992). Infectivity and pathogenicity of *Ascogregarina culicis* (Eugregarinida: Lecudinidae) to *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Journal of Medical Entomology*, 29(1), 1–4. <https://doi.org/10.1093/jmedent/29.1.1>

Yadav, K. K., Bora, A., Datta, S., Chandel, K., Gogoi, H. K., Prasad, G. B. K. S., & Veer, V. (2015). Molecular characterization of midgut microbiota of *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti* from Arunachal Pradesh, India. *Parasites and Vectors*, 8(1). <https://doi.org/10.1186/s13071-015-1252-0>

Zattau, W. C., & McInnis, T. (1987). Life cycle and mode of infection of *Leptolegnia chapmanii* (Oomycetes) parasitizing *Aedes aegypti*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 50(2), 134–145. [https://doi.org/10.1016/0022-2011\(87\)90113-3](https://doi.org/10.1016/0022-2011(87)90113-3)

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. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2010.01012.x>

Capítulo 1

Prospección de patógenos en poblaciones naturales de *Aedes aegypti* y *Ae. albopictus* (Diptera: Culicidae) de la localidad de Eldorado, Misiones

INTRODUCCIÓN

En todos los ambientes habitados por invertebrados, incluidos los ecosistemas acuáticos, se pueden hallar individuos vivos o muertos infectados con algún patógeno, no obstante los patógenos están presentes en niveles bajos en las poblaciones de campo. Los insectos infectados con entomopatógenos a menudo manifiestan síntomas y signos característicos, por ejemplo cambios de coloración, crecimiento visible hacia el exterior del organismo infectante, visualización del microorganismo en el interior del insecto a través de la cutícula, comportamiento inusual, etc. (Lacey, 2012).

Los cambios de coloración pueden ser sutiles o drásticamente diferentes, como la iridiscencia azul en larvas de mosquitos, la cual indica una infección viral iridiscente, y desaparece rápidamente con la muerte del huésped. La presencia de áreas melanizadas de la cutícula (generalmente en forma de puntos negros) se debe a las respuestas inmunitarias del huésped frente a la infección por nemátodos, hongos, baculovirus o microsporidios.

Entre los signos físicos, por ejemplo los hongos producen un crecimiento exuberante y colorido de sus hifas sobre el cuerpo de los insectos. Las infecciones por microsporidios producen tejidos hipertrofiados, opacos y blanquecinos, observables a través de la cutícula.

Durante los dos años del desarrollo del trabajo de campo de la presente tesis se llevó a cabo un amplio muestreo mensual en busca de patógenos en larvas de *Aedes aegypti* y *Ae. albopictus* en diferentes sitios y hábitats de la ciudad de Eldorado.

MATERIALES Y MÉTODOS

Metodología de muestreo

La metodología de colecta e identificación de inmaduros fue descrita en el capítulo 1 de la Sección I.

Observación macroscópica

Las muestras de inmaduros colectadas fueron trasladadas vivas al laboratorio en conservadoras acondicionadas con geles refrigerantes.

Cada muestra proveniente de un hábitat en particular se dispuso en un recipiente plástico para su mantenimiento en el laboratorio. Las larvas fueron observadas en busca de algún síntoma característico de coloración o movilidad.

Observación microscópica

Se tomaron pequeños grupos de larvas de cada muestra, se colocaron en una caja de Petri y se extrajo el agua excedente con una pipeta, hasta que las larvas quedaron adheridas en el fondo de la misma. Las observaciones se realizaron bajo la luz de un microscopio estereoscópico (Zeiss Stemi 2000-C) (1X). Se observó por transparencia el intestino de la larva en faz dorsal y ventral invirtiendo la posición de la cápsula. Se buscó detectar la hipertrofia característica de los núcleos celulares en los ciegos gástricos y el intestino posterior infectados con Baculovirus. Para la detección de la sintomatología de la familia Iridoviridae se colocó a las larvas sobre un fondo oscuro y se las observó bajo lupa, con el fin de evidenciar el color iridiscente característico de las infecciones patentes por virus de esta familia (Becnel & White, 2007). En los casos en los que se observó alguna sintomatología sospechosa la larva se dispuso sobre un vidrio portaobjetos, con una pipeta plástica se extrajo el agua excedente de manera que la larva quede inmóvil sobre el vidrio. Se observó con un aumento de 10 y 40X, bajo microscopio de luz convencional (Olympus CX31) con los aumentos 10X y 40X.

Disección de aparato digestivo

Las disecciones se realizaron bajo la luz de un microscopio estereoscópico (Zeiss Stemi 2000-C) (1X) sobre un portaobjetos en una gota de solución salina estéril (CINa al 10%), utilizando pinzas entomológicas de punta fina sujetando la larva desde la porción cefálica y estirando desde el sifón respiratorio del final del abdomen. Una vez extraído el tracto digestivo se colocó un cubreobjetos y se realizó la observación bajo microscopio de luz convencional (Olympus CX31) con los aumentos 10X y 40X. De cada tipo de hábitat y sitio se tomaron muestras para la disección del intestino medio, como se explica en detalle en el capítulo 3 de la presente sección.

Detección molecular

Las larvas que fueron encontradas muertas en los criaderos fueron conservadas en alcohol 96 % para la detección futura de denonucleovirus, dado que en esta etapa del trabajo no fue posible su procesamiento.

Las larvas de *Aedes albopictus* fueron procesadas como se detalla en el capítulo 2 para la detección de la bacteria endosimbionte *Wolbachia*.

RESULTADOS

Durante la colecta de material en campo se encontraron larvas muertas, que luego en el laboratorio se identificaron como *Aedes aegypti*, las cuales fueron conservadas para análisis futuros. No se observó sintomatología relacionada a la presencia de hongos entomopatógenos, Baculovirus ni virus iridiscentes.

En una larva de *Aedes aegypti* se observó sintomatología sospechosa de infección con microsporidios, dicha muestra fue conservada para su análisis futuro.

Los únicos microorganismos encontrados como resultado de las disecciones de *Aedes aegypti* y *Ae. albopictus* fueron *Ascogregarina culicis* y *A. taiwanensis*, desarrollado en el capítulo 3 de esta sección.

La detección molecular de *Wolbachia* en larvas de *Ae. albopictus* fue positiva, con la presencia de las cepas *wAlbA* y *wAlbB*, desarrollado en el capítulo 2 de esta sección.

CAPITULO 2

Wolbachia en una población natural de *Aedes albopictus* en la localidad de Eldorado, Misiones

INTRODUCCIÓN

Wolbachia (Rickettsiaceae) es una bacteria endosimbionte, Gram negativa y de transmisión maternal (vertical) localizada principalmente en las gónadas de artrópodos, entre ellos en un amplio rango de insectos, con tasas de infección que varían entre 16 % y 66 % (Hilgenboecker *et al.*, 2008). Además de artrópodos, dentro de la especie existen serogrupos que infectan a filarias (Werren *et al.*, 1995).

Su dispersión exitosa se debe, en gran parte, a la capacidad de producir alteraciones en la reproducción de sus hospedadores provocando un incremento de su frecuencia en la población, por lo cual son consideradas parásitos reproductivos. Ante la necesidad de los últimos años de encontrar estrategias de control para insectos plaga y vectores de enfermedades, que sean ambientalmente amigables, *Wolbachia* ha tomado un papel central (Brelsfoard & Dobson, 2009). Su mecanismo de transmisión vertical asegura la expansión de la infección en el tiempo y el espacio dentro de una misma especie. Además tiene la capacidad de transferirse horizontalmente y pasar desapercibida por el sistema inmune del hospedador, ya que no induce ni suprime la transcripción de genes antimicrobianos (Bourtzis *et al.*, 2000). Adicionalmente algunas cepas de *Wolbachia* tienen la capacidad de interferir en la replicación de virus patógenos, constituyendo por lo tanto una de las herramientas más prometedoras para el control de mosquitos transmisores de arbovirosis (Mousson *et al.*, 2012; Sigle & McGraw, 2019).

Taxonomía y filogenia

La especie tipo del género *Wolbachia* fue descrita por Hertig & Walbach (1924) como una rickettsia que residía en los ovarios del mosquito *Culex pipiens* Linnaeus.

Filogenéticamente pertenece al Phylum proteobacteria, orden Rickettsiaceae, familia Anaplasmataceae. Hasta el momento solo se ha descrito una especie *Wolbachia pipientis* Hertig, dentro del género *Wolbachia*.

En base al análisis de la secuencia ribosomal 16S se han identificado ocho supergrupos (A-H). Los supergrupos C y D están presentes en las filarias; y el resto de los supergrupos se localiza en los artrópodos (insectos, arácnidos,

garrapatas y crustáceos), siendo los más comunes A y B (Fig. 1). Existe un debate en cuanto a si todas las bacterias dentro del clado deben recibir la designación *W. pipientis* o si se debe aplicar una nomenclatura de especies diferentes. Por convención se la nombra utilizando el género *Wolbachia* y la cepa, que se basa en la identificación del huésped y el supergrupo, por ejemplo wAlbA es la cepa perteneciente al supergrupo A que infecta a *Aedes albopictus* (Casiraghi *et al.*, 2005; Werren *et al.*, 2008)

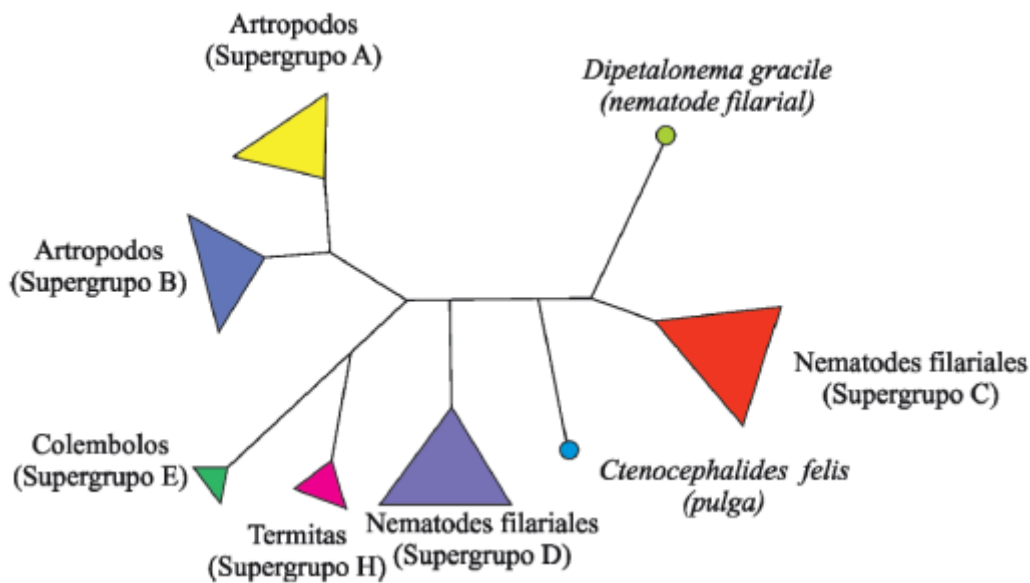


Figura 1. Árbol filogenético no enraizado de los principales supergrupos de *Wolbachia* según lo ilustraron Werren *et al.*, 2008. Tomado de Rodriguero (2013).

Métodos de detección e identificación de cepas de *Wolbachia*

Con el surgimiento de los métodos de tipificación molecular se reveló que la infección por *Wolbachia* estaba muy extendida en la naturaleza, y en los insectos particularmente, donde el 65% de las especies están infectadas (Hilgenboecker *et al.*, 2008). Para la detección de *Wolbachia* se utilizan diferentes genes, como por ejemplo, el gen del ciclo celular bacteriano (*ftsZ*), porciones del RNAr 16S, una secuencia del gen que codifica una proteína de superficie de *Wolbachia* (*wsp*), que además permite dividir a la bacteria en subgrupos (Werren *et al.*, 1995; Zhou *et al.*, 1998)

En el año 2006 se estableció un método universal de tipificación molecular multilocus (MLST) útil para caracterizar las diferentes cepas, el mismo utiliza

porciones de cinco genes *gatB*, *coxA*, *hcpA*, *ftsZ* and *fbpA*. Permite una tipificación de cepas confiable, una nomenclatura unificada para *Wolbachia* y una base de datos centralizada y curada para el almacenamiento y la gestión de datos (Baldo *et al.*, 2006; Werren *et al.*, 2008).

Efectos de la infección por *Wolbachia*

Las manipulaciones que realiza *Wolbachia* sobre su hospedador se pueden dividir en alteraciones reproductivas y no reproductivas.

1. Alteraciones reproductivas: existen dos tipos de estrategias presentadas por esta bacteria:

- Estrategias que distorsionan la proporción de sexos, en este caso la progenie femenina es mayoría.

Partenogénesis telitóquica: causada por la interrupción del ciclo celular durante el desarrollo embrionario temprano, lo que lleva al desarrollo diploide de huevos no fertilizados hacia hembras. Es menos común que la incompatibilidad citoplasmática.

Androcidio o matanza masculina: la muerte de los machos ocurre principalmente durante la embriogénesis, dando como resultado mayor disponibilidad de alimento para las hembras.

Feminización: la proliferación de *Wolbachia* dentro de la glándula androgénica inhibe su función, provocando que individuos que en condiciones normales se desarrollarían como machos, lo hagan como hembras.

- Estrategias que no distorsionan la proporción de sexos:

Incompatibilidad citoplasmática (IC): es un efecto post fertilización donde el esperma de los machos infectados causa la esterilidad de las hembras que no portan la infección. Un cruzamiento resulta incompatible cuando un macho infectado se cruza con una hembra no infectada, lo que determina la muerte del embrión en desarrollo. Por el contrario el cruzamiento entre un macho sano y una hembra infectada, y el cruzamiento entre dos individuos infectados con la misma cepa son totalmente compatibles. Mediante esta alteración se eliminan las hembras no infectadas. Este tipo de IC es “unidireccional” porque los apareamientos son incompatibles en un único sentido: hembra sana y macho infectado; el cruzamiento entre una hembra infectada y un macho sano resulta

compatible. El otro tipo de incompatibilidad se denomina “bidireccional”, se da cuando el macho y la hembra que se cruzan poseen cepas diferentes de *Wolbachia* (Hilgenboecker *et al.*, 2008; Werren *et al.*, 2008).

2. Alteraciones no reproductivas: el efecto *popcorn* fue descubierto en una cepa de *Wolbachia* de *Drosophila melanogaster* Meigen, aunque la bacteria está inactiva durante el desarrollo de la mosca, en el adulto prolifera rápidamente en tejidos nerviosos y musculares provocando una masiva degeneración que resulta en la muerte prematura del insecto (Benzer & Min, 1997).

Infección por *Wolbachia* en mosquitos

Los mosquitos están infectados por los supergrupos A o B de *Wolbachia*, que a su vez se clasifican en sub grupos de cepas (Werren *et al.*, 1995; Zhou *et al.*, 1998). Los sub grupos no muestran congruencia con los linajes filogenéticos de sus hospedadores, por ejemplo el subgrupo Pip se encuentra en especies de *Aedes* Meigen, *Culex* Linnaeus y *Armigeres* Theobald (Zhou *et al.*, 1998; Kittayapong *et al.*, 2000). Dentro de los mosquitos también se producen superinfecciones de dos o más cepas (Werren *et al.*, 1995; Zhou *et al.*, 1998).

La distribución de la bacteria dentro de la familia Culicidae es no aleatoria, algunos grupos como los anofelinos no presentan infección natural con *Wolbachia*, en contraste con la sub familia Culicinae, donde su presencia se detectó en el 39,5% de las 147 analizadas (Bourtzis *et al.*, 2014). En *Ae. aegypti* no se había reportado infección natural hasta hace algunos años atrás, cuando se hallaron mosquitos infectados en Florida, Estados Unidos, con prevalencias de 4,3 % para *wAlbB* y 57,4 % superinfectados (*wAlbA/wAlbB*) (Coon *et al.*, 2016; Kulkarni *et al.*, 2019).

Aedes albopictus está naturalmente infectado con las cepas *wAlbA* o *wAlbB* o superinfectado con ambas, la cepa *wAlbA* se encuentra en la naturaleza en una densidad más baja (Dutton & Sinkins, 2004). La superinfección es definida como la infección con dos o más cepas de *Wolbachia*; permite el intercambio genético entre los supergrupos aumentando la diversidad genética de las bacterias (Werren *et al.*, 1995; Zhou *et al.*, 1998; Jiggins *et al.*, 2001). El análisis de la variación genética dentro de cada cepa de diferentes poblaciones

de *Ae. albopictus* evidenció una escasa variación en sus genes 16S RNAr, *wsp* o *ftsZ* (Kambhampati *et al.*, 1993; Armbruster *et al.*, 2003; de Albuquerque *et al.*, 2011).

La dinámica de transmisión de *Wolbachia* es extremadamente favorable en *Ae. albopictus*, con una alta tasa de transmisión materna e incompatibilidad citoplasmática elevada, donde ambas cepas provocan IC, es decir letalidad embrionaria en cruces entre hembras no infectadas y machos infectados, o entre machos y hembras infectadas con diferentes cepas (Kambhampati *et al.*, 1993; Calvitti *et al.*, 2012). En poblaciones hospedadoras que incluyen individuos infectados y no infectados la IC proporciona una ventaja reproductiva a las hembras superinfectadas, al aparearse exitosamente con todos los tipos masculinos; en contraste las hembras no infectadas son incompatibles con los machos infectados, reduciendo el éxito reproductivo (Dobson *et al.*, 2004). En cuanto a los efectos sobre el *fitnees* del mosquito, dependen de la combinación de diferentes factores, como el genotipo del hospedador, la cepa de *Wolbachia*, su localización en los tejidos del hospedador y la interacción con el ambiente (Dobson *et al.*, 2001; Mc Graw & O' Neill, 2004). Gavotte *et al.* (2010) realizando cruzamientos experimentales observó que el impacto de la infección depende del sexo del hospedador y del nivel de competencia por los recursos. En condiciones de alta densidad poblacional las hembras infectadas son menos competitivas que las no infectadas; en cambio a baja densidad poblacional las hembras infectadas presentan una tasa mayor de supervivencia.

La bacteria se distribuye ampliamente en los tejidos de este hospedador, convirtiéndola en una poderosa herramienta para la propagación de transgenes que podrían bloquear la trasmisión de parásitos y virus (Sinkins, 2004). De todas formas la cepa *wAlbA* posee una tasa más baja de transmisión materna, porque la cepa *wAlbB* tiene una densidad más alta (Dutton & Sinkins, 2004).

Otro de los efectos de *Wolbachia* sobre las especies vectoras de patógenos es limitar su capacidad de transmitirlos (Hedges *et al.*, 2008; Moreira *et al.*, 2009; Glaser & Meola, 2010; Mousson *et al.*, 2012; Hussain *et al.*, 2013; Rosset *et al.*, 2016; Tsai *et al.*, 2017).

Aplicaciones de *Wolbachia* en el control biológico

La amplia distribución de *Wolbachia*, así como su capacidad para manipular la reproducción de sus hospedadores, la convierten en una potencial herramienta para el control de plagas e insectos vectores de enfermedades (Saridaki & Bourtzis, 2009; Rodríguez, 2013). Dentro de las estrategias utilizadas para tal fin se encuentran: la supresión poblacional o técnica del insecto incompatible, que utilizaría a la bacteria como un factor esterilizante; el reemplazo poblacional o estrategia de impulso, empleándola como un vehículo para impulsar fenotipos deseables en poblaciones naturales, por ejemplo el efecto “popcorn”, que podría ser utilizado para reducir la longevidad de los adultos; y el aprovechamiento de los eventos de recombinación que ocurren en la bacteria como herramienta para manipular genéticamente poblaciones de insectos mediante la introducción de genes de interés dentro del genoma de *Wolbachia*. Es importante resaltar que incluso puede infectarse a insectos que naturalmente no posean *Wolbachia*, proceso conocido como transfección (Braig *et al.*, 1994; Xi *et al.*, 2005). De todas formas el fenotipo expresado por *Wolbachia* en su hospedador es una función de la cepa bacteriana en sí, de la densidad de esa cepa en particular, del fondo genético del hospedador y de sus capacidades fisiológicas (Braig *et al.*, 2002; Moreira *et al.*, 2009).

En los mosquitos la alteración reproductiva más común provocada por *Wolbachia* es la incompatibilidad citoplasmática. Existen antecedentes de la aplicación de esta técnica, en *Ae. albopictus* se realizó el reemplazo de las cepas que naturalmente infectan al mosquito, *wAlbA* y *wAlbB*, por la cepa de *Culex pipiens wPip*, observando su utilidad como una tecnología alternativa para la producción de machos estériles útiles para la técnica del insecto estéril (Calvitti *et al.*, 2012). De igual manera, en *Ae. aegypti* se han realizado diversos trabajos de transfección, entre ellos se realizó la transfección con la cepa nativa de *Ae. albopictus wAlbA* y *wAlbB*, y se demostró que luego de algunas generaciones se establecen infecciones estables que generan altas tasas de incompatibilidad citoplasmática (Xi *et al.*, 2005; Ant *et al.*, 2018).

Estudios previos en poblaciones naturales de mosquitos en Argentina

Los estudios realizados previamente en Argentina son escasos, por ejemplo en *Cx. quinquefasciatus* provenientes de la ciudad de La Plata se estudió la infección con *Wolbachia* (Morais *et al.*, 2012).

En la provincia de Misiones, Chuchuy *et al.* (2018) estudiaron la prevalencia de cepas de *Wolbachia* en una población de *Ae.albopictus* del Parque Nacional Iguazú ubicado en la ciudad de Puerto Iguazú, ubicada a 100 km de Eldorado. Dicha población es polimórfica para la infección por *Wolbachia*, con individuos no infectados, super infectados con las cepas *wAlbA* y *wAlbB*, o infectados únicamente con *wAlbB*.

Además utilizando la técnica MLST confirmaron la identidad de *wAlbB* como miembro del subgrupo B como parte de un primer enfoque para investigar el potencial papel de esta bacteria en la modulación de la competencia vectorial.

El conocimiento de la distribución de *Wolbachia* proporciona una visión de su evolución y dinámica poblacional, esta información es relevante para comprender y predecir el resultado de las estrategias de control basadas en la misma. Un paso inicial importante para planificar cualquier programa de control es determinar si una población presenta la infección por este endosimbionte. En consecuencia, el screening en especies vectoras y no vectoras constituye además un acto de "bioprospección" que facilita el descubrimiento de nuevas variantes de *Wolbachia* con características deseables que se pueden utilizar para infectar artificialmente las especies de mosquito (de Albuquerque *et al.*, 2011; Bourtzis *et al.*, 2014).

En este contexto y sumado a los escasos estudios realizados en América del Sur se plantean los siguientes objetivos:

- Determinar la prevalencia y diversidad de cepas de *Wolbachia* presentes en estados inmaduros de *Ae. albopictus* de la localidad de Eldorado, Misiones.
- Determinar si existe infección por *Wolbachia* en *Ae. aegypti*.
- Determinar la prevalencia de infección estacional y espacial de las cepas encontradas en *Ae. albopictus*.
- Determinar si existe una relación entre la temperatura del hábitat y la cepa *wAlbB* presente en *Ae. albopictus*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Extracción de ADN

El ADN genómico fue extraído de larvas de *Ae.albopictus* colectadas en la ciudad de Eldorado, previamente determinadas mediante claves dicotómicas y conservadas en alcohol 96% a -20° C. Durante el primer año de muestreo se armaron pools de individuos (cinco larvas como máximo) por cada hábitat dentro de cada sitio (cementerio, vivienda familiar, gomería y parque). Durante el segundo año las larvas se procesaron de manera individual (en los casos que fue posible cinco por hábitat) para obtener valores de prevalencia más reales de cada una de las cepas presentes, y además identificar las larvas libres de infección. Además se realizaron extracciones de ADN de larvas de *Ae. aegypti* tomadas al azar. La extracción del ADN se realizó mediante un kit comercial (*Wizard (R) Genomic DNA Purification* PROMEGA) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

La detección de la infección por *Wolbachia* se realizó mediante la técnica PCR multiplex, utilizando los cebadores que amplifican la proteína superficial *wsp*, 328 F (5'-CCA GCA GAT ACT ATT GCG-3 ') y 691 R (5'-AAA AAT TAA ACG CTA CTC CA-3') para la cepa *wAlbA* (501 pb); y 183 F (5'-AAG GAA CCG AAG TTC ATG-3 ') y 691 R para la cepa *wAlbB* (379 pb), descritos por Zhou *et al.* (1998). Los productos de amplificación esperados son de 379 pb y 501 pb respectivamente.

La reacción de amplificación fue preparada a un volumen final de 25 μ l conteniendo 1 μ l de ADN genómico de *Ae.albopictus*; 2,5 μ l (10 pmol/ μ l) de cada cebador; 2,5 μ l de buffer de reacción TAS 10X; 2,5 μ l de dNTPs (PROMEGA 10mM por cada uno de los nucleótidos), 0,2 μ l de la enzima Taq polimerasa (HIGHWAY 5U/ μ l); 3 μ l de cloruro de magnesio (3mM/ μ l) y 11,8 μ l de agua libre de DNAsas. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: desnaturalización inicial a 95° C por un minuto; 35 ciclos de desnaturalización a 94° C por un minuto, *annealing* de los cebadores a 55° C por un minuto y medio; extensión a 72° C por dos minutos; y una extensión final de 10 minutos a 72° C. La amplificación se llevó a cabo en un termociclador *BIOER GenePro*. Los

productos de PCR se resolvieron utilizando geles de agarosa al 2% suplementados con *Gel Red* (GenBiotech). La visualización se realizó utilizando luz UV con un transiluminador (*uvipro Bronze*).

En las muestras en las que sólo se detectó una cepa de la bacteria, y debido a la posible competencia entre ADN de *wAlbA* y *wAlbB* en la PCR multiplex, se realizaron amplificaciones independientes para detectar *wAlbA* o *wAlbB*. Los resultados negativos de las PCR independientes se repitieron dos veces. La calidad de la extracción de ADN se verificó utilizando los cebadores S1718 y A2442 descritos por Normark (1996) que amplifican el locus de ADNmt (COI) de la citocromo oxidasa de mosquito, con las condiciones previamente reportadas por Rodriguez *et al.* (2010). Las muestras negativas para COI se excluyeron del conjunto de datos.

Las muestras que fueron negativas para los cebadores *wsp* pero positivas para los cebadores COI se clasificaron como no infectadas. Todos los resultados negativos para la infección por *Wolbachia* se verificaron además con los cebadores *coxA* (subunidad de citocromo oxidasa I) y *fbpA* (fructosa-bisfosfato de aldolasa) descritos por Baldo *et al.* (2006).

Análisis de datos

Para analizar la relación entre las variables independientes pH y temperatura del criadero, y la variable dependiente infección por *Wolbachia* se consideraron las siguientes situaciones: larvas infectadas versus no infectadas; larvas infectadas con cepa *wAlbB* vs doble infección cepas *wAlbA/wAlbB*; larvas infectadas doble infección cepas *wAlbA/wAlbB* vs larvas no infectadas. Se excluyó del análisis la infección únicamente con cepa *wAlbA* porque era una sola larva. Los análisis se realizaron con el software StataCorp, 2011.

Se utilizó un Modelo de Probabilidad Lineal (MPL): es un modelo de regresión lineal múltiple en el que la variable dependiente es una variable binaria (o *dummy*), la cual sólo toma valores de cero y uno; y la probabilidad de respuesta es lineal en los parámetros. En el MPL β mide la variación de la probabilidad de éxito al variar x_j , permaneciendo los demás factores constantes

$$\Delta P (y=1|x) = \beta_j \Delta x_j$$

El modelo de regresión múltiple permite estimar el efecto de diversas variables explicativas sobre un evento cualitativo. La ecuación estimada se escribe como:

$$\hat{y} = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \dots + \beta_k x_k$$

Donde: \hat{y} es la probabilidad de éxito predicha, por lo tanto β_0 es la probabilidad de éxito predicha cuando cada una de la x_j es igual a cero, el coeficiente de pendiente β_1 mide la variación de la probabilidad de éxito predicha cuando x_1 aumenta una unidad.

Se construyeron 3 modelos:

Modelo 1: probabilidad de “estar infectado” (con cualquier caso) versus “no estar infectado”

Modelo 2: probabilidad de “estar infectado tipo B” versus “no estar infectado”

Modelo 3: probabilidad de “estar infectado tipo A más B” versus “no estar infectado”

RESULTADOS

Detección y prevalencia de cepas de *Wolbachia* presentes en larvas de *Aedes albopictus* de la localidad de Eldorado, Misiones.

Se realizaron 502 extracciones de ADN distribuidas de la siguiente manera, desde el mes de mayo de 2016 a abril de 2017, 81 pooles; de mayo de 2017 a abril de 2018, 407 extracciones individuales.

Se obtuvieron fragmentos del tamaño esperado correspondientes al gen *wsp*, según la cepa de *Wolbachia* presente (Fig. 1). En las muestras de ADN de larvas de *Ae. aegypti* no se detectó infección por *Wolbachia*.

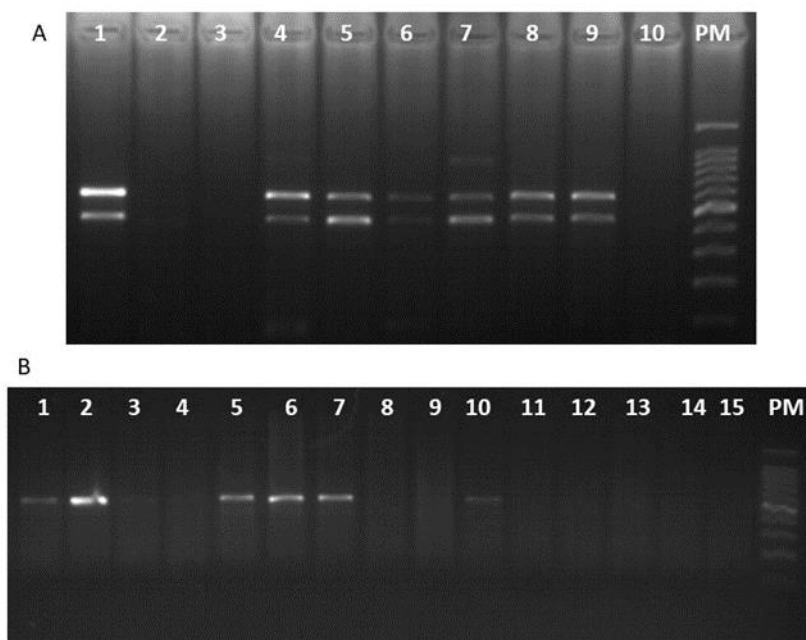


Figura 1. Gel de agarosa al 2% con cepas *wAlbA* y *wAlbB* en ADN de larvas de *Aedes albopictus* de la localidad de Eldorado, Misiones. A) carril 1, 4, 5, 6, 7, 8, 9: *wAlbA* y *wAlbB*; carril 2, 3: sin infección, carril 10: control negativo B) Carril 1, 2, 5, 6, 7, 10: *wAlbB*; carril 3, 4, 8, 9, 11, 12, 13, 14: sin infección; carril 15: control negativo. PM: peso molecular de 500 a 100 pb.

La prevalencia de infección del primer año de muestreo, cuando se analizaron pooles de larvas fue de 96,29 %, de ese valor el 2,47 % correspondió a *wAlbA*, el 6,17 % a *wAlbB* y 87,65 % a una infección doble con las cepas *wAlbA/wAlbB*.

Para el segundo año, de un total de 407 larvas de *Ae. albopictus*, la prevalencia de infección fue del 76,89 %, donde el 0,25 % únicamente estaba infectado con *wAlbA*; el 23,84 % sólo con *wAlbB* y 52,80 % representaba doble infección con las cepas *wAlbA/wAlbB*. En la Tabla 1 se muestran los valores de prevalencia con las extracciones individuales según los sitios de colecta (viviendas familiares, gomería, cementerio, parque). La cepa *wAlbA* fue identificada por única vez en una larva de *Ae. albopictus* recolectada en un neumático de una gomería.

Tabla 1. Prevalencia de infección por *Wolbachia* por sitios de colecta en la ciudad de Eldorado, Misiones.

Sitio	Cepa <i>wAlbA</i>	Cepa <i>wAlbB</i>	<i>wAlbA/wAlbB</i>
Vivienda familiar	0 %	24,64 %	52,17 %
Cementerio	0%	24,89 %	51,55 %
Gomería	3,03 %	18,18 %	60,61 %
Parque	0 %	13,33 %	60,00 %

En la Tabla 2 se observa la prevalencia de las infecciones simples y la doble infección en las muestras individuales, la prevalencia de la doble infección en las diferentes estaciones del año se mantiene en valores similares, con un leve descenso en verano y otoño. La infección con la cepa *wAlbB* fue mayor en verano y otoño del año 2018.

Tabla 2. Prevalencia de infección por *Wolbachia* por estación en la ciudad de Eldorado, Misiones.

Estación	N° <i>Ae. alb.</i>	N° extrac.	% <i>wAlbA</i>	% <i>wAlbB</i>	% <i>wAlbA/wAlbB</i>
Otoño 17	484	66	0	9,1	54,54
Invierno 17	243	31	0	19,35	64,51
Primavera 17	275	103	0,97	10,68	60,17
Verano 18	721	164	0	33,54	47,56
Otoño 18	657	43	0	44,17	41,86

Modelos de Probabilidad Lineal (MPL)

En el primer modelo que analizó la probabilidad de “estar infectado” (con cualquier caso) versus “no estar infectado” se obtuvo como resultado que a un incremento de una unidad (°C) en la variable temperatura se incrementa la probabilidad de estar infectado con *Wolbachia* en un 1,976 %. El pH presenta un efecto negativo y significativo, por cada incremento en una unidad del pH promedio disminuye un 16,8 % la probabilidad de estar infectado.

Para el segundo modelo se analizó la probabilidad de “estar infectado tipo B” versus “no estar infectado”, donde un incremento en una unidad (°C) de la temperatura aumenta un 4,27 % la probabilidad de estar infectado con la cepa wAlbB. El pH por un aumento en una unidad disminuye un 43% la probabilidad de infección con la cepa wAlbB.

Para el tercer modelo probabilidad de “estar infectado tipo A más B” versus “no estar infectado, por cada un incremento en una unidad (°C) de la temperatura aumenta un 1,68 % la probabilidad de estar superinfectado con las cepas wAlbA/wAlbB. El pH nuevamente presenta un efecto negativo, donde el incremento en una unidad disminuye un 13,6 % la probabilidad de infección doble. De los resultados de los modelos utilizados se observa que a valores más básicos de pH, menor la probabilidad de infección por *Wolbachia*, con un efecto más marcado sobre la cepa wAlbB, de manera similar el incremento de temperatura provocó un efecto mayor sobre la presencia de la cepa wAlbB. En la Tabla 3 se detallan los coeficientes y el nivel de significancia de cada modelo.

Tabla 3. Modelos de probabilidad lineal usados para analizar efectos de pH y temperatura sobre la infección por *Wolbachia*.

Variables dependientes	Temperatura	pH
Infectados con <i>Wolbachia</i>	Coef: 0,1976	Coef: -0,1684
	Robust Std. Err.: 0,0066305	Robust Std. Err: 0,00729973
	t: 2,98	t: 3,04
	p: 0,003	p: 0,003
	Intervalo 95% [0,006725 0,32803]	Intervalo 95% [0,007816 0,365171]
Infectados cepa wAlbB.	Coef: 0,4276	Coef: -0,43
	Robust Std. Err:0,0091453	Robust Std. Err: 0,009695
	t: 4,68	t: 3,04
	p:0,000	p: 0,003
	Intervalo 95% [0, 247044 0,60823]	Intervalo 95% [0,324437 0,707336]
Infectados con cepas wAlbA/wAlbB	Coef: 0,168948	Coef: -0,136
	Robust Std. Err: 0,0076073	Robust Std. Err: 0,0097209
	t: 2,22	t: 2,04
	p: 0,027	p: 0,042
	Intervalo 95% [0,019185 0,031871]	Intervalo 95% [0,000741 0,390158]

DISCUSIÓN

La bacteria endosimbionte *Wolbachia* causa múltiples alteraciones reproductivas en su huéspedes, entre ellas la incompatibilidad citoplasmática, que podría provocar una reducción significativa en la fecundidad y la tasa de eclosión de huevos (Noor *et al.*, 2015). Las investigaciones sobre infección natural de *Wolbachia* en mosquitos son cruciales para evaluar la posibilidad de utilizar estrategias de control de vectores basadas en su uso (Rasgon & Scott, 2004; de Albuquerque *et al.*, 2011; Das *et al.*, 2014; Noor *et al.*, 2015). Investigaciones previas revelaron que el mosquito *Aedes albopictus* está infectado de manera natural con las cepas de *Wolbachia* *wAlbA* y *wAlbB* (Sinkins *et al.*, 1995; Werren, 1997; Zhou *et al.*, 1998). En el presente estudio se detectó infección natural por *Wolbachia* en *Ae. albopictus* de Eldorado, Misiones, revelando infección y súper infección con dos tipos de cepas *wAlbA* y *wAlbB*.

La incompatibilidad citoplasmática (IC) unidireccional permite que *Wolbachia* invada rápidamente poblaciones de insectos no infectados, porque las hembras infectadas pueden aparearse con éxito con machos infectados y no infectados, mientras que las hembras no infectadas solo pueden producir progenie cuando se aparean con machos no infectados (Turelli & Hoffmann, 1991). Los machos superinfectados son incompatibles con hembras *wAlbA*, en cambio las hembras superinfectadas son compatibles con machos *wAlbA*, esta IC unidireccional permitiría la rápida propagación de superinfecciones a través de poblaciones que solo albergan *wAlbA* (Dutton & Sinkins, 2004). Luego de ingresar a una población se espera que *Wolbachia* se extienda rápidamente hasta su fijación, la superinfección con las cepas *wAlbA/wAlbB* en diversas poblaciones de campo estudiadas es común y se encuentra fijada, lo que sugiere una transmisión vertical eficiente de ambas cepas (Noor Afizah *et al.*, 2015).

En Argentina en un estudio previo realizado en la provincia de Misiones, en la ciudad de Puerto Iguazú, distante a 100 km de la localidad de Eldorado, Chuchuy *et al.* (2018) hallaron una prevalencia de infección en hembras de *Ae. albopictus* de 83,3%, donde el 16,7 % presentaba infección simple con la cepa *wAlbB*, y un 66,7 % doble infección *wAlbA/wAlbB*; en los machos 75 % de prevalencia, con infección simple *wAlbB* 12,5 % y 62,5 % de doble infección; no se encontraron individuos con una simple infección con la cepa *wAlbA*. En la

ciudad de Eldorado, la prevalencia de infección fue similar; aunque con valores superiores para la cepa *wAlbB* y menores para la prevalencias de los doble infectados *wAlbA/wAlbB*. Además se encontró un individuo infectado únicamente con la cepa *wAlbA*.

En otros lugares del mundo las prevalencias son más altas, por ejemplo en la India Das *et al.* (2014) encontraron una prevalencia de infección de 99,2 %, donde el 3,2% era de la cepa *wAlbA* y 96,8 % doble infección *wAlbA/wAlbB*. En el sudeste de Asia las prevalencias encontradas son cercanas al 100%; con hembras superinfectadas con *wAlbA/wAlbB*, machos con infección única por *wAlbB* (67,4%) y superinfectados con *wAlbA/wAlbB* (32,6%) (Noor *et al.*, 2015). Zhang *et al.* (2014) en Malasia encontró prevalencias de doble infección *wAlbA/wAlbB* en hembras y machos de 99,09 y 92,04 % respectivamente; únicamente en los machos se detectó infección simple con la cepa *wAlbA* con una prevalencia de 7,96%; y una sola hembra con la cepa *wAlbB*. Tsai *et al.* (2017) en Taiwán encontraron una alta prevalencia de doble infección con valores de 92,8 a 97,2 % de prevalencia.

La baja prevalencia de la cepa *wAlbA* encontrada en Eldorado coincide con otros estudios en el mundo; Kittayapong *et al.* (2002) en Tailandia encontró una prevalencia del 0,6 %, sin embargo es posible que la eficiencia de la transmisión materna en diferentes regiones geográficas sea distinta, de todas formas la tasa de trasmisión de la cepa *wAlbA* es ligeramente más baja que para la cepa *wAlbB* (Dutton & Sinkins, 2004; Zhang *et al.*, 2014).

En Brasil, en el estado de Pernambuco, la prevalencia fue de 91,61 %, de los cuales el 67,13% estaban infectados con ambas cepas *wAlbA/wAlbB* (de Albuquerque *et al.*, 2011).

En otro estudio de prevalencia de *Wolbachia* en *Ae.albopictus* y *Ae.aegypti* realizado en Florida y Nueva Méjico en EE UU por Kulkarni *et al.* (2019) se reportó infección natural para *Ae. aegypti*, con una prevalencia del 57,4% de la cepa *wAlbB*; para *Ae. albopictus* la prevalencia fue de 92,3% (84,6 % *wAlbA/wAlbB* y 7,7 % cepa *wAlbB*). En el presente trabajo las detecciones negativas para *Ae. aegypti* de poblaciones simpátricas con *Ae. albopictus* demuestran que al menos en las cepas *wAlbA* y *wAlbB* no habría transferencia horizontal.

Wolbachia puede verse afectada por diferentes factores, como la temperatura y los factores nutricionales de cría del mosquito, las altas temperaturas y la nutrición deficiente a menudo llevan a una menor densidad de *Wolbachia* en *Ae. albopictus* (Dutton & Sinkins, 2004; Wiwatanaratanabutr & Kittayapong, 2009). La densidad de la bacteria puede influir en la IC y en la tasa de transmisión, ambas son las variables más importantes que determinan la dinámica de invasión de *Wolbachia* en una población (Dutton & Sinkins, 2004).

La cepa de *Wolbachia* wAlbB es menos susceptible a los efectos de las altas temperaturas que la cepa wMel usada para infectar y controlar poblaciones de *Ae. aegypti*, esto sugiere que esta cepa podría ser la adecuada para el reemplazo poblacional en ambientes cálidos (Nguyen *et al.*, 2015; Ross *et al.*, 2017; Nazni *et al.*, 2019). Actualmente la efectividad de dicha estrategia, con pruebas de campo en marcha en más de 10 países, podría verse influenciada por las temperaturas ambientales que disminuyen la densidad de *Wolbachia*, reduciendo así la capacidad de invadir y persistir en la población y bloquear los arbovirus (Ross *et al.*, 2019). En nuestro estudio encontramos que el aumento de la temperatura en el microambiente incrementa la probabilidad de infección con cepa wAlbB, este dato resulta de gran interés porque esta cepa tendría la potencialidad de utilizarse para transinfección de *Ae. aegypti* en esta región sub tropical.

Los microorganismos generalmente viven en comunidades de especies que interactúan; y los microorganismos que colonizan mosquitos no son una excepción. Estas interacciones suelen ser mediadas por modificaciones ambientales, una de las más comunes es el cambio de pH. El pH es un parámetro muy general, en el que esencialmente todos los microorganismos influyen y dependen. Las modificaciones del pH pueden facilitar o inhibir el crecimiento, y en casos extremos causar la extinción de una población bacteriana. El crecimiento de las comunidades bacterianas que viven en un determinado ambiente puede conducir a cambios en el pH, y este cambio de pH puede promover o inhibir el crecimiento bacteriano de todas las especies microbianas presentes en dicho ambiente (Ratzke & Gore, 2018). En el presente trabajo el pH es otro factor físico del hábitat que tendría influencia sobre la infección por *Wolbachia*, especulamos con la posibilidad que el pH tendría un efecto indirecto sobre *Wolbachia*, al afectar otras bacterias que se encuentran en el hábitat y que

tendrían la capacidad potencial de colonizar los tejidos de *Ae. albopictus*. No se han encontrado antecedentes de su efecto sobre *Wolbachia*, probablemente debido al escaso número de estudios de infección en larvas de mosquitos que existen.

BIBLIOGRAFÍA

Azpuruá J; De La Cruz D; Valderama A & Windsor D. 2010. *Lutzomyia* Sand Fly Diversity and Rates of Infection by *Wolbachia* and an Exotic *Leishmania* Species on Barro Colorado Island, Panamá. PLOS Neglected Tropical Diseases, 4(3), e627.

Baldo, L., Hotopp, J.C., Dunning J., Keith A., Bordenstein, S.R., Biber, S.A., Choudhury, R. R., Hayashi, C.I., Maiden, M.C.J., Tettelin, H., Werren, J.H. 2006. Multilocus Sequence Typing System for the Endosymbiont *Wolbachia pipientis*. Appl. Environ. Microbiol. 72, 7098–7110.

Bourtzis, K., Dobson, S. L., Xi, Z., Rasgon, J. L., Calvitti, M., Moreira, L. A., Gilles, J. R. L. (2014). Harnessing mosquito-*Wolbachia* symbiosis for vector and disease control. Acta Trópica, 132(1), S150–S163.

Bourtzis K; Pettigrew MM & O'Neill SL. 2000. *Wolbachia* neither induces nor suppresses transcripts encoding antimicrobial peptides. Insect Molecular Biology. 9: 635-639.

Braig, H.R., H. Guzman, R.B. Tesh and S.L. O'Neill. 1994. Replacement of the natural *Wolbachia* symbiont of *Drosophila simulans* with a mosquito counterpart. Nature 367: 453-455.

Braig HR; Turner BD; Normark BB & Stouthamer R. 2002. Microorganism-induced parthenogenesis. En: Hughes RN (ed.), Reproductive biology of invertebrates. Volumen XI: Progress in asexual reproduction, Oxford 6 IBH publishing, New Delphi. 1-62.

Brelsfoard CL & Dobson SL. 2009. *Wolbachia*-based strategies to control Insect pests and disease vectors. Asian Pacific Journal of Molecular Biology and Biotechnology. 17(3):55-63.

Chuchuy, A., Rodriguero, M. S., Ferrari, W., Ciota, A. T., Kramer, L. D., & Micieli, M. V. (2018). Biological characterization of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in Argentina: Implications for arbovirus transmission. Scientific Reports, 8(1), 1–8. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-23401-7>

Das, B., Satapathy, T., Kar, S. K., & Hazra, R. K. (2014). Genetic structure and *Wolbachia* genotyping in naturally occurring populations of *Aedes albopictus* across contiguous landscapes of Orissa, India. PLoS ONE, 9(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0094094>

de Albuquerque, A. L., Magalhães, T., & Ayres, C. F. J. (2011). High prevalence and lack of diversity of *Wolbachia pipientis* in *Aedes albopictus* populations from Northeast Brazil. Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz, 106(6), 773–776. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762011000600021>

Dobson, S. L., Marsland, E. J., Rattanadechakul, W. (2001). *Wolbachia* Induced Cytoplasmic Incompatibility in Single- and Superinfected *Aedes albopictus* (Diptera : Culicidae). Journal of Medical Entomology, 38(3), 382–387.

Dobson, S. L., Rattanadechakul, W., & Marsland, E. J. (2004). Fitness advantage and cytoplasmic incompatibility in *Wolbachia* single- and superinfected *Aedes albopictus*. Heredity, 93(2), 135–142. <https://doi.org/10.1038/sj.hdy.6800458>

Dutton, T. J., & Sinkins, S. P. (2004). Strain-specific quantification of *Wolbachia* density in *Aedes albopictus* and effects of larval rearing conditions. Insect Molecular Biology, 13(3), 317–322. <https://doi.org/10.1111/j.0962-1075.2004.00490.x>

European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). 2012. Guide-lines for the Surveillance of Invasive Mosquitoes in Europe. Stockholm, ECDC Technical Report, Available from: [_http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/TER-Mosquito-surveillance-guidelines.pdf_](http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/TER-Mosquito-surveillance-guidelines.pdf).

Gavotte, L., Mercer, D. R., STOECKLE J. J. & Dobson, S. L. (2010). Costs and benefits of *Wolbachia* infection in immature *Aedes albopictus* depend upon sex and competition level. Journal Invertebrate Pathology, 105(3), 341–346. <https://doi.org/10.1038/jid.2014.371>

Hertig M & Wolbach SB. 1924. Studies of rickettsia-like microorganisms in insects. Journal of Medical Research. 44: 329-374.

Joanne, S., Vythilingam, I., Yugavathy, N., Leong, C. S., Wong, M. L., & AbuBakar, S. (2015). Distribution and dynamics of *Wolbachia* infection in Malaysian *Aedes albopictus*. *Acta Trópica*, 148, 38–45.

Kambhampati, S., Rai, K. S. & Burgun, S. J. 1993. Unidirectional Cytoplasmic Incompatibility in the Mosquito, *Aedes albopictus*. *Evolution* (N. Y). 47, 673–677

Kittayapong, P., Baimai, V., & O'Neill, S. L. (2002). Field prevalence of *Wolbachia* in the mosquito vector *Aedes albopictus*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 66(1), 108–111. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2002.66.108>

Kulkarni, A., Yu, W., Jiang, J., Sanchez, C., Karna, A. K., Martinez, K. J. L., ... Xu, J. (2019). *Wolbachia pipientis* occurs in *Aedes aegypti* populations in New Mexico and Florida, USA. *Ecology and Evolution*, 9(10), 6148–6156. <https://doi.org/10.1002/ece3.5198>

Mc Graw EA & O'Neill SL. 2004. *Wolbachia pipientis*: Intracellular infection and pathogenesis in *Drosophila*. *Current Opinion in Microbiology*, 7(1), 67–70. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2003.12.003>

Moreira LA; Iturbe-Ormaetxe I; Jeffery JA; Lu G; Pyke AT; Hedges LM; Rocha BC; Hall-Mendellin S; Day A; Riegker M; Hugo LE; Johnson KN; Kay BH; McGraw EA; Van Den Hurk AF; Ryan PA & O'Neill SL. 2009. A *Wolbachia* symbiont in *Aedes aegypti* limits infection with dengue, chikungunya and Plasmodium. *Cell*. 139: 1268-1278.

Mousson L; Zouache K; Arias-Goeta C; Raquin V; Mavingui P & Failloux AB. The Native *Wolbachia* Symbionts Limit Transmission of Dengue Virus in *Aedes albopictus*. *PLOS Neglected Tropical Diseases*. 6: e1989.

Nazni, W. A., Hoffmann, A. A., Noor Afizah, A., Cheong, Y. L., Mancini, M. V., Golding, N., Sinkins, S. P. (2019). Establishment of *Wolbachia* strain AlbB in Malaysian populations of *Aedes aegypti* for dengue control. *BioRxiv*, 775965. <https://doi.org/10.1101/775965>

Nguyen, T. H., Nguyen, H. Le, Nguyen, T. Y., Vu, S. N., Tran, N. D., Le, T. N., ... Hoffmann, A. A. (2015). Field evaluation of the establishment potential of *wMelpop Wolbachia* in Australia and Vietnam for dengue control. *Parasites and Vectors*, 8(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/s13071-015-1174-x>

Noor Afizah, A., Roziah, A., Nazni, W. A., & Lee, H. L. (2015). Detection of *Wolbachia* from field collected *Aedes albopictus* Skuse in Malaysia. *Indian Journal of Medical Research*, 142(AUGUST), 205–210. <https://doi.org/10.4103/0971-5916.164259>

Ono M; Braig H; Munstermann L; Ferro C & O' Neill S. 2001. *Wolbachia* Infections of Phlebotomine Sand Flies (Diptera: Psychodidae). *Journal of Medical Entomology*: 38(2) 237-241.

Park, C. H., Lim, H. W., Kim, H. W., Lee, W. G., Roh, J. Y., Park, M. Y., & Shin, E. H. (2016). High prevalence of *Wolbachia* infection in Korean populations of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae). *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 19(1),

Rasgon, J. L., & Scott, T. W. (2004). An Initial Survey for *Wolbachia* (Rickettsiales: Rickettsiaceae) Infections in Selected California Mosquitoes (Diptera: Culicidae). *Journal of Medical Entomology*, 41(2), 255–257. <https://doi.org/10.1603/0022-2585-41.2.255>

Ratzke, C., & Gore, J. (2018). Modifying and reacting to the environmental pH can drive bacterial interactions. *PLoS Biology*, 16(3), 1–20. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.2004248>

Rodriguero, M. S., Confalonieri, V. A., Guedes, J. V. C. & Lanteri, A. A. 2010. *Wolbachia* infection in the tribe Naupactini (Coleoptera, Curculionidae): association between thelytokous parthenogenesis and infection status. *Insect Mol. Biol.* 19, 631–640.

Rodriguero MS. 2013. *Wolbachia* una pandemia con posibilidades. *Revista de la Sociedad Entomológica Argentina*. 72 (3-4): 117-137.

Ross, P. A., Ritchie, S. A., Axford, J. K., & Hoffmann, A. A. (2019). Loss of cytoplasmic incompatibility in *Wolbachia*-infected *Aedes aegypti* under field conditions. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 13(4), 1–20. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007357>

Ross, P. A., Wiwatanaratnabutr, I., Axford, J. K., White, V. L., Endersby-Harshman, N. M., & Hoffmann, A. A. (2017). *Wolbachia* Infections in *Aedes aegypti* Differ Markedly in Their Response to Cyclical Heat Stress. *PLoS Pathogens*, 13(1), 1–17. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006006>

Sardaki A & Bourtzis K. 2009. *Wolbachia*-induced reproductive parasitism and applications. *Entomologia Hellenica*. 18: 3-16.

Statacorp. 2011. *Stata Statistical Software: Release 12*. College Station, TX: Statacorp LP.

Sinkins, S. P., Braig, H. R., & O'Neill, S. L. (1995). *Wolbachia* superinfections and the expression of cytoplasmic incompatibility. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 261(1362), 325–330.
<https://doi.org/10.1098/rspb.1995.0154>

Suh E; Mercer DR & Dobson SL. 2017. Life shortening *Wolbachia* infection reduces population growth of *Aedes aegypti*. *Acta Trópica*. 172, 232-239.

Tatem AJ; Hay SI; Rogers DJ. 2006. Global traffic and disease vector dispersal. *PNAS*. 10, 6242–6247.

Tsai, C. H., Chen, T. H., Lin, C., Shu, P. Y., Su, C. L., & Teng, H. J. (2017). The impact of temperature and *Wolbachia* infection on vector competence of potential dengue vectors *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in the transmission of dengue virus serotype 1 in southern Taiwan. *Parasites and Vectors*, 10(1), 1–11.
<https://doi.org/10.1186/s13071-017-2493-x>

Turelli, M., & Hoffmann, A. A. (1991). Rapid spread of an inherited incompatibility factor in California *Drosophila*. *Nature*, 353, 440–442.

Wallace H. 2013. Mosquitos genéticamente modificados: preocupaciones actuales. Enang (Malasia): Third World Network.ppt 98.

Werren, J. H. (1997). Biology of *Wolbachia*. *Annual Review of Entomology*, 42(124), 587–609. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.42.1.587>

Werren JH; Baldo L & Clark ME. 2008. *Wolbachia*: Master manipulators of invertebrate biology. *Nature Reviews Microbiology*. 6: 741-751.

Wiwatanaratanabutr, I., & Kittayapong, P. (2009). Effects of crowding and temperature on *Wolbachia* infection density among life cycle stages of *Aedes albopictus*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 102(3), 220–224.
<https://doi.org/10.1016/j.jip.2009.08.009>

Xi, Z., C.C.H. Khoo and S.L. Dobson. 2005. *Wolbachia* establishment and invasion in an *Aedes aegypti* laboratory population. *Science* 310: 326-328.

Zhang, D., Zhan, X., Wu, X., Yang, X., Liang, G., Zheng, Z., Zheng, X. (2014). A field survey for *Wolbachia* and phage WO infections of *Aedes albopictus* in Guangzhou City, China. *Parasitology Research*, 113(1), 399–404. <https://doi.org>

Zhou, W., Rousset, F. & O'Neill, S. 1998. Phylogeny and PCR-based classification of *Wolbachia* strains using wsp gene sequences. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 265, 509–515.

CAPITULO 3

Ascogregarinas (Apicomplexa: Lecudinidae) en poblaciones naturales de *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) de Eldorado, Misiones, Argentina

INTRODUCCION

Ascogregarina

Las Ascogregarinas son protozoos parásitos intracelulares exclusivos de invertebrados (Lantova & Volf, 2014), con una marcada especificidad del hospedador en condiciones naturales. Se los considera en su mayoría no patógenos para sus huéspedes naturales, algunas de ellos de la familia Culicidae, pero nocivos para otros (Roychoudhury *et al.*, 2007).

El género *Ascogregarina* (syn. *Monocystis* von Stein, 1848, *Lankesteria* Mingazzini, 1891 y *Ascocystis* Grasse, 1953) pertenece al Phylum Apicomplexa (Apicomplexa: Lecudinidae), familia Ascogregarinidae. Esta familia además incluye al género *Psychodiella* gregarina que infecta al género *Lutzomyia* (Lantova & Volf, 2014).

Dentro del Phylum existen otros dos órdenes: Archigregarinida y Neogregarinida, se diferencian según el tipo de división celular múltiple o esquizoogonia. El orden Eugregarinorida se caracteriza por ausencia de merogonia y trofozoitos con movimiento deslizante a lo largo de las células del hospedador (Reyes Villanueva, 2004). El género alberga especies que parasitan dípteros, particularmente mosquitos (Culicidae), moscas de las familias Nycteribiidae y Phoridae; y pulgas del orden Siphonaptera (Lantova & Volf, 2014). Su forma invasiva se caracteriza por presentar un único complejo apical responsable de la penetración e invasión celular dentro de los tejidos (Morrison, 2009).

Existen 9 especies descritas para mosquitos (Lantova *et al.*, 2014) las cuales se presentan en la Tabla 1. La especie tipo del género es *Ascogregarina culicis* (Ross, 1898).

Tabla 1. *Ascogregarina* de mosquitos.

<i>Ascogregarina</i>	Mosquito hospedador
<i>Ascogregarina culicis</i> (Ross, 1998)	<i>Aedes aegypti</i> (Lin., 1762)
<i>Ascogregarina taiwanensis</i> (Lien y Levine)	<i>Aedes albopictus</i> (Skuse, 1894)
<i>Ascogregarina lanyuensis</i> (Lien y Levine)	<i>Aedes alcasidi</i> Huang, 1972
<i>Ascogregarina polynesiensis</i> Levine, 1985	<i>Aedes polynesiensis</i> Marks, 1951
<i>Ascogregarina barretti</i> (Vavra, 1969)	<i>Aedes triseriatus</i> (Say, 1823)
<i>Ascogregarina clarki</i> (Sanders y Poinar, 1973)	<i>Aedes sierrensis</i> (Ludlow, 1905)
<i>Ascogregarina geniculati</i> Mustermann y Levine, 1983	<i>Aedes geniculatus</i> (Oliver, 1791)
<i>Ascogregarina tripteroidesi</i> (Bhatia, 1938)	<i>Tripteroides dofleini</i> (Guenther, 1913)
<i>Ascogregarina armigerei</i> (Lien y Levine, 1980)	<i>Armigeres subalbatus</i> (Coquilett, 1898)

Las *Ascogregarinas* se dividen de un modo artificial en dos grupos, según la morfología de los trofozoítos: gregarinas cefalinas (*Cephaline*), cuyo trofozoito o gamonte se divide en tres partes: el epimerito (órgano apical para la adhesión), el protomerito (sección anterior de la célula) y el deuteromerito (sección posterior de la célula). Y el segundo grupo constituido por las gregarinas acefalinas (*Acephaline*), cuyo trofozoito presenta dos partes, el protomerito y el deuteromerito.

Ciclo de vida

Ascogregarina culicis (Ross) es la especie tipo del género *Ascogregarina* motivo por el cual se la utiliza para describir el ciclo de vida, que es similar entre los otros miembros del género. Las larvas de mosquitos se infectan al ingerir los ooquistes presentes en el agua donde se desarrollan. Cada ooquiste contiene ocho esporozoítos que una vez ingeridos por el hospedador se liberan en el intestino e invaden las células epiteliales. Dentro de las células los esporozoítos se transforman a trofozoítos, los cuales son liberados a la luz intestinal cuando la célula epitelial se rompe. Allí se unen a las células epiteliales del intestino y durante la etapa de pupa del mosquito migran a los túbulos de Malpighi, donde se reproducen sexualmente en el mosquito adulto, formando el ooquiste que finalmente es liberado al agua durante la ovoposición de la hembra, o con la muerte del mosquito adulto infectado en el criadero (Roychoudhury & Kobayashi, 2006; Lantova & Volf, 2014) (Fig. 1).

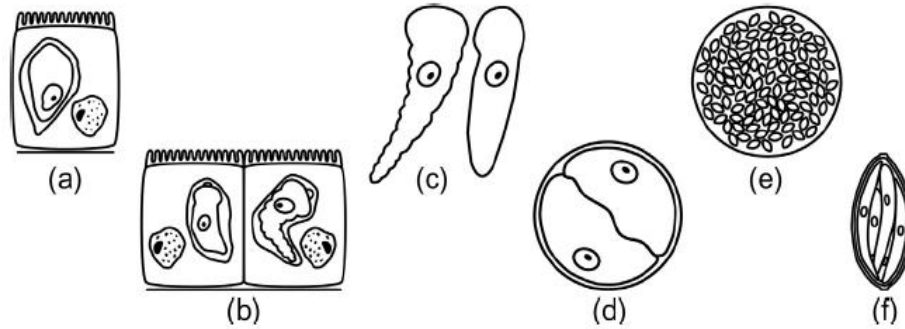


Figura 1. Ciclo de vida de *Ascogregarina culicis*. (a) Esporozoíto intracelular en la célula epitelial del intestino. (b) trofozoíto joven intracelular en la célula epitelial del intestino. (c) trofozoíto extracelular localizado en lumen intestinal. (d) Gametocito. (e) Gametocito maduro con ooquistes, localizado en túbulos de Malpighi de pupas y adultos. (f) Ooquiste con esporozoítos, localizado en túbulos de Malpighi de pupas y adultos y en las heces. Tomado de(Lantova & Volf 2014).

Ascogregarina culicis* y *Ascogregarina taiwanensis

Ascogregarina culicis fue descrita por Ross en la India en 1885 y *Ascogregarina taiwanensis* en Taiwán por Lien & Levine (1980). Se ha demostrado que los ooquistes son capaces de infectar cualquier instar larval, cuando la ingestión ocurre en los estadios tempranos los parásitos sincronizan su desarrollo con el hospedador. Únicamente cuando es ingerido por una larva de IV estadio tardía se detiene su desarrollo en la etapa de gamonte (Roychoudhury & Kobayashi, 2006).

Los ooquistes de ambas especies son resistentes a la desecación, característica que les permite sobrevivir en épocas desfavorables, esto resulta beneficioso considerando que los hábitats de las especies hospedadoras a menudo están sujetos a desecación. En el caso de *A. taiwanensis* se ha observado hasta 6 meses de resistencia en condiciones naturales y 4 meses en condiciones de laboratorio (Roychoudhury & Kobayashi, 2006). Chen & Yang (1996) demostraron que la temperatura del agua afecta el desarrollo del parásito, en *A. taiwanensis* a 29°C se acortó el tiempo de desarrollo y por debajo de los 14°C se extendió, siendo la temperatura óptima de 24° C.

Ambas gregarinas son morfológicamente similares, aunque existen diferencias de forma y tamaño de los trofozoítos que permiten diferenciarlas (Reyes-Villanueva *et al.*, 2001). Además el desarrollo de herramientas moleculares permiten su identificación a partir de extracción de ADN, y

amplificación de la región ribosomal ITS1 e ITS2 y la sub unidad ribosomal (SSU rDNA) (Morales *et al.* ,2005; Roychoudhury *et al.* , 2007).

El estudio de estos protozoos adquirió importancia en los Estados Unidos como una de las hipótesis para explicar el desplazamiento de *Ae. aegypti* (Linnaeus) por *Ae.albopictus* (Skuse). Esta hipótesis centrada en la patogenicidad diferencial de las *Ascogregarinas* (Craig, 1993) se encuentra dentro de los mecanismos de reducción competitiva entre especies, donde la competencia se produce a través de los efectos diferenciales de un parásito o depredador en dos especies concurrentes (Holt & Lawton, 1994) y plantea efectos asimétricos provocados por la infección por ascogregarinas que podrían causar descensos en la densidad de *Ae.aegypti*, el cual se infectaría con la especie parásito natural de *Ae. albopictus*, *A. taiwanensis*, y ésta provocaría efectos negativos en su supervivencia. En cambio la ascogregarina presente en *Ae. aegypti*, *A. culicis* no infectaría a *Ae. albopictus* (Munstermann & Wesson, 1990; Blackmore *et al.*,1995; Juliano, 1998; Reyes-Villanueva *et al.*, 2003).

Impacto de las gregarinas sobre el *fitness* de los mosquitos y especificidad de huésped

La introducción de *Ae.albopictus* al continente americano en la década del 80 (S. XX) y la subsecuente disminución o desplazamiento en algunas regiones de *Ae. aegypti* trajo apareado un interés renovado en el estudio de la ecología de *Ae. albopictus* (Tseng, 2007), por ejemplo centrado en el estudio de las *Ascogregarinas*.

Los resultados obtenidos sobre los efectos de las *Ascogregarinas* sobre su hospedador son contradictorios, algunos de los cuales no reportan evidencia de efectos negativos sobre el *fitness* de los mosquitos, por lo tanto serían parásitos benignos para su huésped natural (Reyes-Villanueva *et al.*, 2003). Sin embargo Comiskey *et al.* (1999) han reportado un aumento de 35 % en la tasa de mortalidad larvaria y un aumento del tiempo de desarrollo, además de la disminución en la longitud del ala y la fecundidad de hembras de *Ae. albopictus* infectadas con *A. taiwanensis*. Trabajando con *A. taiwanensis* otros autores han

reportado tasas de mortalidad para ambas especies de *Aedes* que varían entre 3,2 y 12,6 % (Reyes-Villanueva *et al.*, 2003).

En *Ae. aegypti* infectado con *A. culicis* se ha reportado elevada mortalidad de larvas (Barret, 1968; Comiskey *et al.*, 1999). Otro estudio realizado informa un incremento a la susceptibilidad al DDT en larvas de *Ae. aegypti* resistentes, infectadas con *A. culicis* (Stapp & Casten, 1971). También se observaron efectos de mortalidad elevada cuando se utiliza una gregarina en el huésped no natural (García *et al.*, 1994), sin embargo el ciclo completo del parásito no podría realizarse en el huésped no natural, o sea que no se perpetuaría en el tiempo (Vezzani & Wisnivesky, 2006).

Existe además una influencia del entorno sobre la relación parásito-hospedador representado por la densidad larvaria y los nutrientes disponibles. En el caso de machos y hembras de *Ae. albopictus* las condiciones de hacinamiento larval puede afectar la respuesta a la infección parasitaria (Tseng, 2004). Comiskey *et al.* (1999) reportaron daños más severos en células de los túbulos de Malpighi de hembras de *Ae. albopictus* infectadas con *A. taiwanensis* cuando se criaban en niveles bajos de nutrientes. Sulaiman (1992) se refirió a que los efectos sobre el *fitness* eran mayores a altas dosis de exposición al parásito.

Con respecto a la disminución de la capacidad reproductiva en mosquitos parasitados se ha propuesto como explicación una combinación de los siguientes procesos: el consumo de nutrientes por el parásito, el desvío de nutrientes para reparar tejidos dañados en el hospedador y el uso del sistema inmune para matar al parásito (Comiskey *et al.*, 1999). Incluso las condiciones fisiológicas producto de la infección parasitaria, como por ejemplo liberación de toxinas, puede causar necrosis en las células del hospedador y daño a su membrana plasmática; provocando finalmente la muerte del hospedador (Golstein & Kroemer, 2007).

Respecto a los estudios sobre especificidad hospedador y las infecciones cruzadas éstos son contradictorios, existen algunos trabajos que reportan desarrollo completo de *A. taiwanensis* dentro de otro hospedador que no sea el propio, ejemplo el desarrollo de *A. taiwanensis* en *Ae. taeniorhynchus* (Wiedemann, 1821) (García *et al.*, 1994) y en *Ochlerotatus japonicus* (Theobald) por Erthal *et al.* (2012), sus resultados de todas formas concluyen que es un

hospedador viable, pero no tan competente como *Ae. albopictus*; y la infección cruzada de *A. culicis* y *A. taiwanensis* en *Ae. albopictus* y *Ae. aegypti* respectivamente (Lien & Levine, 1980).

Sin embargo otros autores sostienen que *A. taiwanensis* raramente se desarrolla en otros hospederos (Cominsky & Wesson, 1997; Reeves & Mcculloughb, 2002), inclusive en trabajos experimentales de infección de *Ae. aegypti* con *A. taiwanensis* se ha observado que no logra completar su ciclo de vida (Garcia *et al.*, 1994).

Tseng (2017) realizó experimentos de infección en laboratorio con *A. taiwanensis* en individuos de *Ae. albopictus* producto de la cruce entre dos poblaciones aisladas y obtuvo como resultado una reducción en la producción de ooquistes, que sugieren alguna adaptación de los parásitos a los huéspedes locales, y otorgaría una cierta ventaja a las poblaciones híbridas para escapar a los parásitos.

La importancia de estudiar la biología y la variación estacional de un nuevo aislado geográfico de *Ascogregarina* está relacionado con el efecto diferencial del parásito sobre el hospedador, el cual varía entre los diferentes aislados o cepas geográficas y además depende de la variedad poblacional de *Ae. aegypti* (Sulaiman, 1992; Reyes-Villanueva *et al.*, 2003).

Con respecto a su discutido uso en el control biológico de insectos vectores, Reyes- Villanueva (2004) sostiene que su potencial utilización depende del enfoque de las investigaciones hacia dos caminos: el estudio de la patogenicidad en hospedadores no naturales: esto incluye la recuperación de ooquistes y realización de infecciones experimentales observando los efectos sobre el desarrollo del mosquito. Y la realización de estudios a campo, sobre todo en zonas tropicales para ampliar el conocimiento sobre este grupo, y poder caracterizar nuevos aislados geográficos desde el punto de vista de la patogenicidad. De todas formas la patogenicidad de la cepa geográfica utilizada debe permitir que el hospedador complete su ciclo y de esta forma pueda liberar los estadios infectantes del parásito al medio, para que tenga una continuidad y no sea necesario en cada generación del mosquito introducir artificialmente ooquistes al medio (Tseng 2007).

La infección natural en mosquitos con *Ascogregarina* fue reportada en diversas partes del mundo (Reyes-Villanueva *et al.*, 2013). El mayor número de

investigaciones se realizaron en Estados Unidos, debido a la hipótesis de desplazamiento descripta previamente. Los estudios se han enfocado sobre todo en el aislamiento de ooquistes, ciclos de vida, infección cruzada entre *Ae. aegypti* y *Ae. albopictus* de ambos parásitos (Sulaiman, 1992; Chen, 1999; Reyes-Villanueva, 2001).

Los escasos estudios sobre este género en Sudamérica corresponden a Brasil (Passos & Tadei, 2008; Prophiro *et al.*, 2017) y a la zona templada de Argentina (Albicocco & Vezzani, 2009; Vezzani & Wisnivesky, 2006). Estos trabajos se han centrado principalmente en estudios de prevalencia e intensidad de infección, no existiendo trabajos específicos experimentales sobre patogenicidad de las cepas sudamericanas (Vezzani & Rubio, 2016). En los últimos años el desarrollo de técnicas moleculares para la identificación de estos protozoos (Morales *et al.*, 2005; Templeton *et al.*, 2010) posibilitó que se revelen a campo infecciones cruzadas, como por ejemplo en el trabajo realizado en el año 2017 por Prophiro *et al.* en el sur de Brasil.

En el presente capítulo se plantean los siguientes objetivos:

- Identificar las especies de *Ascogregarina* spp. halladas en especies de mosquitos invasivas: *Ae. aegypti* y *Ae. albopictus*.
- Caracterizar morfológicamente los trofozoitos de *Ascogregarina culicis* y *A. taiwanensis*.
- Determinar la prevalencia e intensidad de infección de *A. culicis* y *A. taiwanensis* en la localidad de Eldorado, Misiones.
- Confirmar mediante biología molecular la identificación de las especies de *Ascogregarina* halladas.

MATERIALES Y METODOS

Área de estudio

El muestro se realizó en la localidad de Eldorado, situada al noroeste de la provincia de Misiones (26° 24' S 54° 38' W). Ver materiales y métodos capítulo 1.

Metodología de muestreo

La colecta de larvas y pupas de mosquitos se realizó desde mayo de 2016 a abril de 2018. Las larvas fueron colectadas de diferentes tipos de recipientes artificiales ubicados en: viviendas familiares, lugares públicos como cementerios, y todo sitio urbano con potenciales hábitats para estos mosquitos (gomerías, talleres mecánicos, chatarrerías); y de recipientes naturales como: bromélias, tacuaras y huecos de árbol, ubicados principalmente en un ambiente natural de la ciudad.

Cuando fue posible se tomó el volumen total de agua del recipiente de cría y se colectaron los individuos con pipeta plástica previa descarga del agua a una bandeja de plástico blanca. Para aquellos recipientes cuyo tamaño impidió tomar el volumen total de agua se colectaron 10 cucharones (300 ml cada cucharón). En los recipientes naturales el agua se extrajo con un frasco aspirador. Las variables registradas para cada recipiente se detallaron en el capítulo 1 de la sección Ecología de especies invasivas.

Las larvas de los diferentes estadios y las pupas fueron trasladadas vivas en recipientes plásticos identificados con fecha de colecta y tipo de recipiente, para su procesamiento al laboratorio de Entomología perteneciente al Instituto de Medicina Regional de la Universidad Nacional el Nordeste. Las larvas de los primeros estadios fueron criadas en el laboratorio hasta IV estadio. Las pupas fueron criadas hasta la emergencia del adulto para su identificación.

De cada uno de los recipientes se procedió a la identificación y registro de las especies de *Aedes* mediante clave dicotómica (Consoli y de Oliveira, 1994).

Detección y caracterización morfológica de *Ascogregarina* spp.

Luego de identificar las larvas y separar los recipientes en las siguientes categorías: positivos para *Ae. aegypti*, positivos para *Ae. albopictus* y positivos para ambas especies, se tomaron al azar mensualmente tres recipientes de cada una de las categorías, y dentro de ellas 10 larvas de III y IV estadio para realizar la disección y detección de los protozoos. Es importante resaltar que la abundancia de *Ae. albopictus* durante todo el período de estudio fue de 1/10 con respecto a *Ae. aegypti*, por lo cual en algunos meses de muestreo no se obtuvieron larvas para realizar la disección en busca de ascogregarinas.

Las disecciones se realizaron bajo la luz de un microscopio estereoscópico (Zeiss Stemi 2000-C) (1X) sobre un portaobjetos en una gota de solución salina estéril (CINa al 10%), utilizando pinzas entomológicas de punta fina sujetando la larva desde la porción cefálica y estirando desde el sifón respiratorio del final del abdomen.

Una vez extraído el tracto digestivo se colocó un cubreobjetos y se realizó la observación bajo microscopio de luz convencional (Olympus CX31) con los aumentos 10X y 40X para registrar la presencia y abundancia de trofozoítos de *Ascogregarina* spp.

Los trofozoítos de *Ascogregarina* spp. fueron identificados siguiendo la descripción de Reyes-Villanueva *et al.* (2001). Se tomaron fotografías con una cámara *INFINITY 1* y se realizaron las mediciones de largo y ancho de 49 trofozoítos de *A. culicis* y 75 de *A. taiwanensis*. Además se conservaron los restos del intestino en agua destilada a -20° C para la posterior extracción de ADN.

Prevalencia e intensidad de infección

Para la descripción de la variación espacio temporal se utilizaron descriptores cuantitativos de poblaciones de parásitos siguiendo las definiciones de Bush & Shostak (1997).

Prevalencia: número de hospedadores infectados sobre el total de hospedadores examinados.

Intensidad de infección: número de individuos de una especie particular de parásito en un solo hospedador infectado.

Intensidad Media (IM): promedio de la intensidad de infección de una especie particular de parásito entre los miembros infectados.

Análisis de datos

Los análisis fueron realizados con el software estadístico InfoStat /E versión 2018 (Di Rienzo *et al.*, 2018). La prevalencia de infección mensual, por estación y entre sitios fue comparada utilizando Chi cuadrado de Pearson. Para la comparación de la intensidad media mensual se utilizó el test de Kruskal-Wallis, realizando posteriormente una prueba de comparaciones de a pares. Se realizó además, una prueba de correlación de Spearman entre la intensidad media y la temperatura del agua contenida en el recipiente.

Además se realizó un análisis multivariado, utilizando estadística descriptiva multivariada y un análisis de conglomerados. El análisis de conglomerados tiene por finalidad agrupar objetos por un conjunto de valores de varias variables. Este análisis se utilizó para los distintos tipos de sitios de muestreo (vivienda familiar, cementerio y gomería) y los distintos tipos de recipientes en grupos homogéneos en función de las similitudes o similaridades, tomando como variables la intensidad media de *Ascogregarinas* en el recipiente, la T° del criadero, la presencia de la otra especie de *Aedes* diferente al hospedador natural y cobertura del recipiente. Se utilizó el coeficiente de similaridad de Gower y método de encadenamiento promedio. Las variables fueron categorizadas para la utilización del *software* estadístico. Los datos utilizados se encuentran en la tabla de la sección 1, capítulo 1.

Identificación molecular de *Ascogregarina* spp.

Extracción de ADN

El ADN genómico fue extraído de un pool de intestino parasitado de *Ae. aegypti* y *Ae. albopictus* respectivamente, para confirmar la identidad de la especie. Se utilizó un kit comercial (Wizard (R) Genomic DNA Purification PROMEGA) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Amplificación por PCR

La amplificación del ADN para la identificación de *A. culicis* y *A. taiwanensis* se realizó mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), utilizando los cebadores descritos por Morales *et al.* (2005) (Tabla 2). El cebador AU corresponde a un cebador *forward* que hibrida con el gen ribosomal 18S de *Ascogregarina* spp. El cebador *reverse* AT hibrida en la región ITS2 de *A. taiwanensis* y el AC se une a la región ITS1 del ADNr. Los productos de amplificación que se esperan son de 450 y 210 pb respectivamente.

Tabla 2. Cebadores utilizados para la identificación de *A. culicis* y *A. taiwanensis*

Nombre del cebador	Secuencia
AU	5' ACCGCCCGTCCGTTCAAT CG 3'
AT	5' GAGAAGCCGTCGTCAATACAGC 3'
AC	5' CAC TTAGTGTTTTGTTTGATGTC 3'

La reacción de amplificación fue preparada a un volumen final de 25 μ l conteniendo 3 μ l de ADN genómico de *Ae. aegypti* o *Ae. albopictus*, 2,5 μ l (10 pmol/ μ l) de cebadores sentido (**AT** o **AC**), 2,5 μ l (10 pmol/ μ l) de cebador anti sentido (**AU**), 2,5 μ l de buffer de reacción TAS 10X, 2, 5 μ l de dNTPs (PROMEGA 10mM por cada uno de los nucleótidos), 0,2 μ l de la enzima Taq polimerasa (HIGHWAY 5U/ μ l), 3 μ l de cloruro de magnesio (3mM/ μ l) y 10,8 μ l de agua libre de DNAsas. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: desnaturalización inicial a 94° C por un minuto; 30 ciclos de desnaturalización a 94° C por un minuto, *annealing* de los cebadores a 50° C por un minuto; extensión a 72° C por dos minutos; y una extensión final de 10 minutos a 72° C (Prophiro *et al.*, 2017). La amplificación se llevó a cabo en un termociclador *BIOER GenePro*. Los productos de PCR se resolvieron utilizando geles de agarosa al 2% suplementados con *Gel Red* (GenBiotech). La visualización se realizó utilizando luz UV con un transiluminador (*uvipro Bronze*).

Los productos de PCR fueron purificados utilizando *Agarose Gel DNA Extraction Kit* (Roche). Los fragmentos genómicos fueron enviados para su secuenciación a *Macrogen Inc.* (Seúl, Corea del Sur).

Análisis de secuencias y relación filogenética

Las secuencias obtenidas fueron visualizadas y editadas con el *software* libre *Chromas* versión 2.6.5. (<http://www.technelysium.com.au>). Luego se realizó un alineamiento con las secuencias de la base de datos del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) a través del programa BLAST (*The Basic Local Alignment Search Tool*: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), para confirmar la identidad de la misma. Posteriormente se construyó la secuencia consenso y se confirmó su identidad por comparación con una secuencia de referencia obtenida de la base de datos del NCBI. Para el alineamiento y análisis de relación filogenética se utilizó el *software* MEGA (*Molecular Evolutionary Genetics Analysis*) versión 6 (Tamura *et al.*, 2013) (<http://www.megasoftware.net>). El alineamiento se realizó con la secuencia obtenida en este estudio y todas las secuencias de *Ascogregarina culicis* depositadas en la base de datos del *GenBank*. La secuencias de *A. taiwanensis* incluidas fueron únicamente las que correspondían a Brasil (Tabla3).

Tabla 3. Origen de las secuencias descargadas del *GenBank* utilizadas en el análisis.

Especie	N° de acceso	Especie hospedadora	Origen del aislado
<i>Ascogregarina culicis</i>	AY327258	<i>Aedes aegypti</i>	Colombia
<i>Ascogregarina culicis</i>	DQ 462457	<i>Aedes aegypti</i>	Vietnam
<i>Ascogregarina culicis</i>	KU238665	<i>Aedes aegypti</i>	Ecuador
<i>Ascogregarina culicis</i>	KU238664	<i>Aedes aegypti</i>	Ecuador
<i>Ascogregarina culicis</i>	KU238663	<i>Aedes aegypti</i>	Ecuador
<i>Ascogregarina culicis</i>	DQ 462456	<i>Aedes aegypti</i>	Tailandia
<i>A. taiwanensis</i>	KM387707	<i>Aedes aegypti</i>	Brasil
<i>A. taiwanensis</i>	KM387708	<i>Aedes aegypti</i>	Brasil

Los alineamientos con el programa *Clustal W* (Thompson *et al.*, 1997) permitieron la construcción de un árbol filogenético utilizando el método de Máximo Likelihood y Neighbor Joining, y el parámetro de distancia Kimura 2, la topología del árbol se evaluó con 1000 bootstraps.

RESULTADOS

Detección y caracterización morfológica de *Ascogregarina* spp.

Los trofozoítos de *A. culicis* fueron observados en el lumen del intestino medio y en el exterior del mismo, en larvas de III y IV estadio de *Ae.aegypti*. El tamaño fue bastante variable, presentando una media de $82,22 \mu\text{m}$ ($\pm 21,69$) de largo y $28,27 \mu\text{m}$ ($\pm 9,61$) de ancho, $N=49$. Con respecto a la forma de los mismos la parte anterior que comprende el protomerito y epimerito es perceptiblemente más ancha que la parte cónica correspondiente al deutomerito, siendo similar a una coma (Fig. 2).

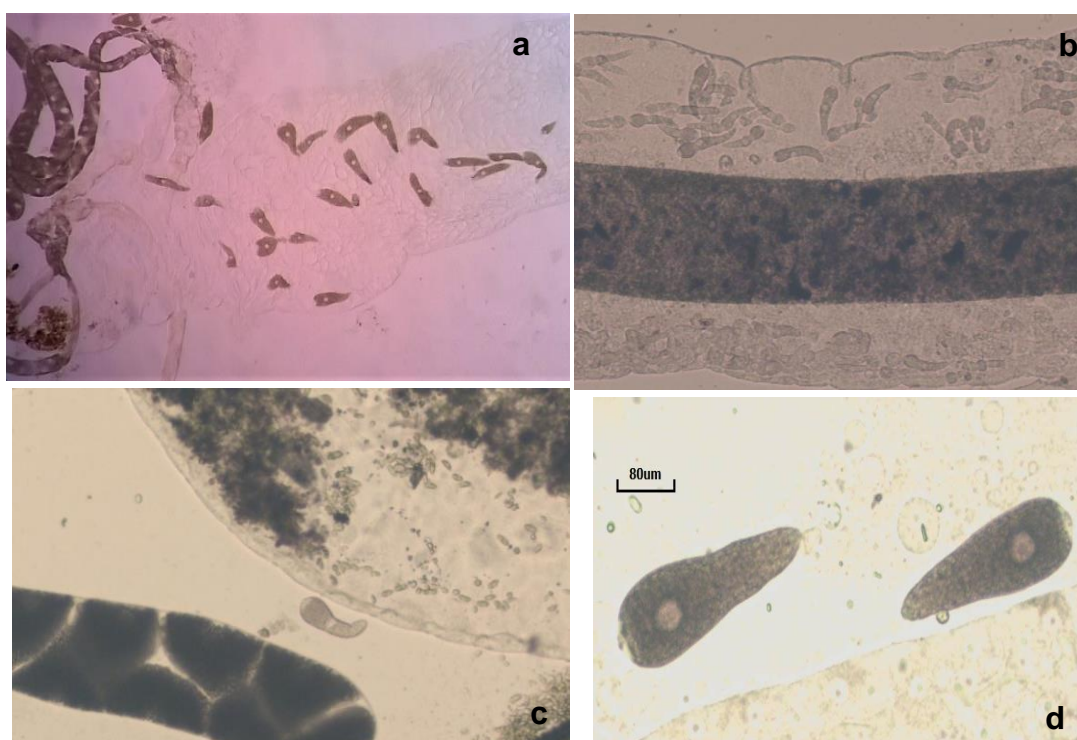


Figura 2. a) y b) trofozoítos de *Ascogregarina culicis* dentro del intestino medio de *Aedes aegypti*, 10 x, c) y d) trofozoíto fuera del intestino, 10x y 40 x respectivamente.

Los trofozoítos de *A. taiwanensis* encontrados en el lumen del intestino medio de larvas de *Ae.albopictus* presentaron un deutomerito mucho más corto y que termina en forma más abrupta que *A. culicis* (Fig. 3). Con respecto al tamaño presentaron una longitud de $81,60 \mu\text{m}$ ($\pm 20,4$) y un ancho de $40,04 \mu\text{m}$ ($\pm 13,24$), $N=75$.

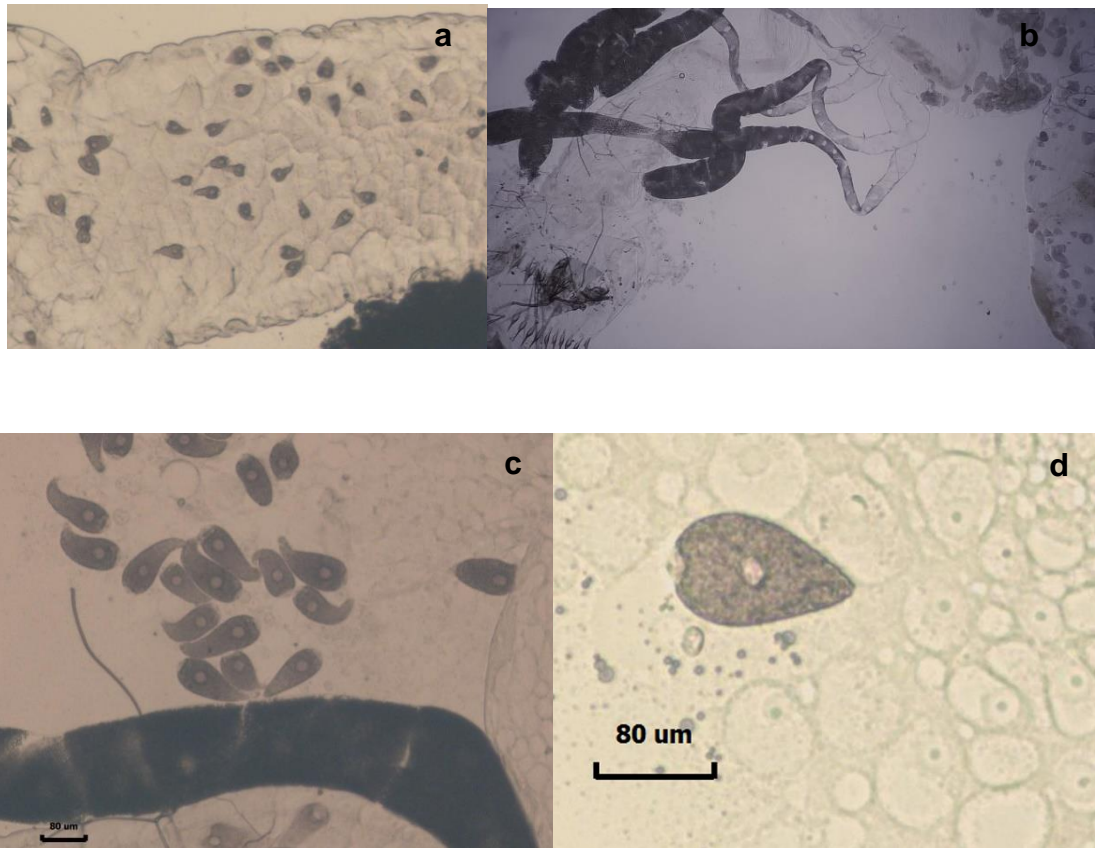


Figura 3. a) y b) trofozoítos de *Ascogregarina taiwanensis* dentro del intestino medio de *Aedes albopictus* 10 x, c) y d) trofozoítos fuera del intestino, 10x y 40 x respectivamente.

Prevalencia e intensidad de infección de *Aedes* spp. con ascogregarinas

Ascogregarina culicis

Se diseccionaron 1333 larvas de *Ae.aegypti* provenientes de diferentes sitios de la ciudad de Eldorado, encontrándose una prevalencia total de infección de 34,81% (N=464). El número total de inmaduros de *Ae. aegypti* colectados durante el período de muestreo fue de 9820.

El análisis de las prevalencias mensuales arrojó como resultado diferencias estadísticamente significativas entre los meses de estudio (Chi cuadrado de Pearson =185,90; $p < 0,0001$). Los meses con mayores prevalencias de infección durante el período de estudio fueron: febrero de 2017 con 63,63% (N= 88), septiembre de 2016 con 61,53 % (N=39), abril de 2018 con 58,57% (N= 70), julio de 2017 con 58,33 % (N=47), diciembre de 2016 con 55,84 % (N=77), octubre de 2017 con 53,06 (N=49), y marzo de 2018 con 47,62%

(N=63) mostraron las mayores prevalencias de infección del período de estudio (Fig. 4).

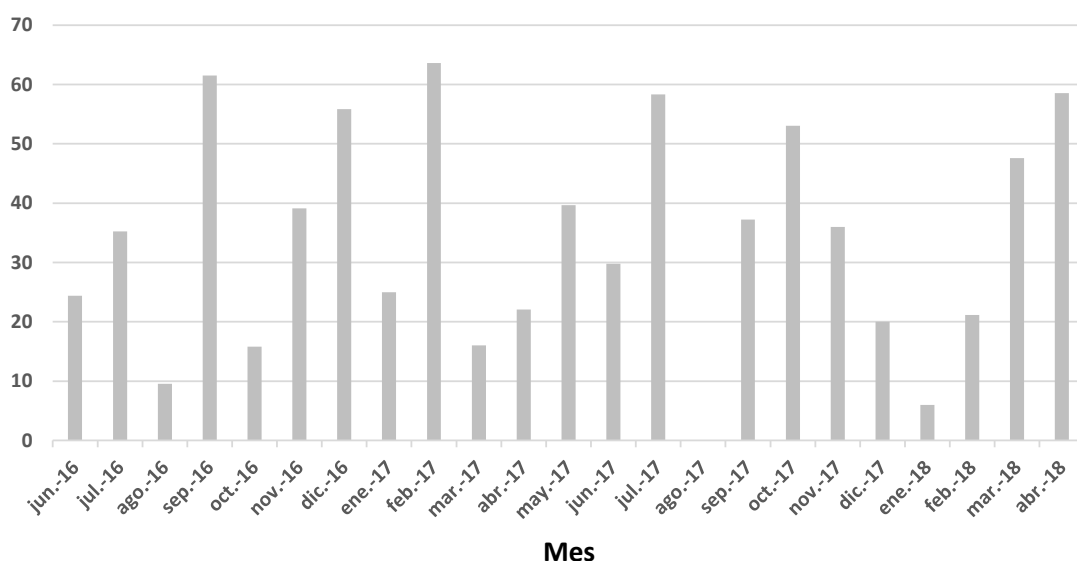


Figura 4. Prevalencia de infección mensual de *Ascogregarina culicis* en *Aedes aegypti* en la localidad de Eldorado, Misiones, colectados entre junio de 2016 y abril de 2018.

Con respecto al análisis de prevalencias estacionales del período de muestreo se encontraron diferencias significativas, Chi cuadrado de Pearson =84,59 ($p < 0,0001$). Las estaciones con mayor infección fueron otoño del 2018 con un valor de 53,38 % (N= 71) y verano 2016/2017 con un valor de 47,47 % (N= 122) (Fig. 5).

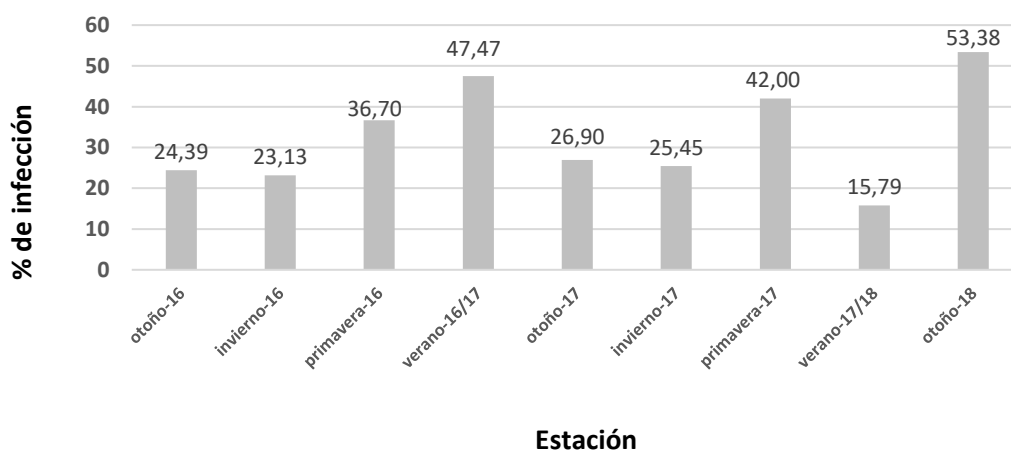


Figura 5. Prevalencia de infección estacional de *Ascogregarina culicis* infectando *Aedes aegypti* en la localidad de Eldorado, Misiones.

La comparación entre las prevalencias de los diferentes sitios muestreados (viviendas familiares, gomerías y cementerios) presentó diferencias estadísticamente significativas (Chi cuadrado de Pearson =81,69; $p < 0,0001$). La prevalencia de infección más alta fue en gomerías 50,51 % (n=198).

Considerando los tipos de recipientes la comparación de prevalencias presentó diferencias estadísticamente significativas (Chi cuadrado de Pearson =140,85; $p < 0,0001$). La mayor prevalencia de infección se encontró en chatarras y neumáticos (Fig. 6).

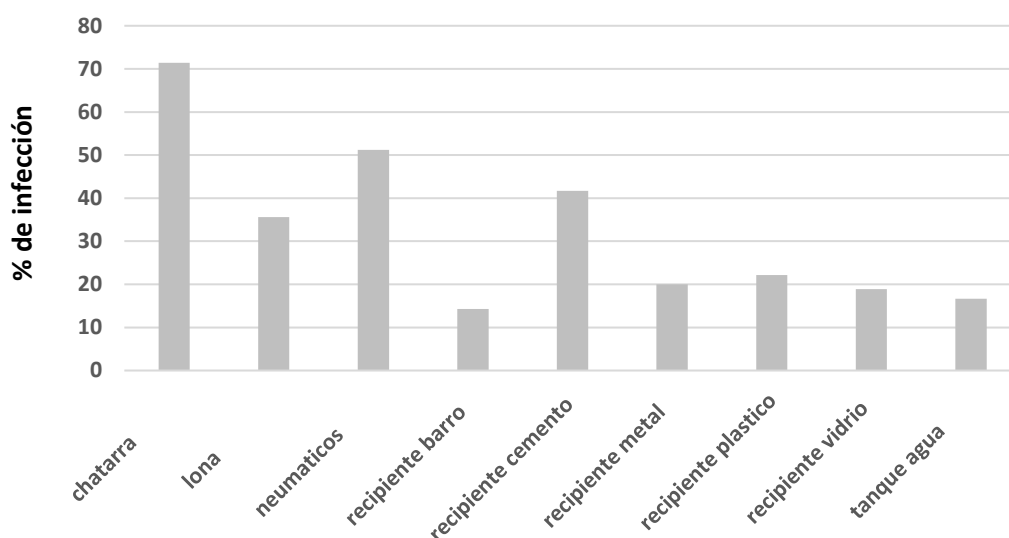


Figura 6. Prevalencia de infección de *Ascogregarina culicis* en diferentes tipos de recipientes de cría de *Aedes aegypti* en la localidad de Eldorado, Misiones.

La intensidad de infección en las larvas de *Ae. aegypti* varió entre 1 y 250 trofozoítos por individuo. La intensidad media total fue de 28,94 (DE 35,78).

La comparación de la intensidad IM entre los meses de estudio reveló diferencias significativas ($H=100,15$ $p < 0,0001$). La prueba de comparaciones entre las IM mostró que la diferencia significativa se presentó entre los meses de abril de 2017, 2018 y septiembre de 2016, 2017 (con los mayores valores de IM) y el resto de los meses de estudio y el mes de junio de 2016 que presentó la menor IM (Fig. 7).

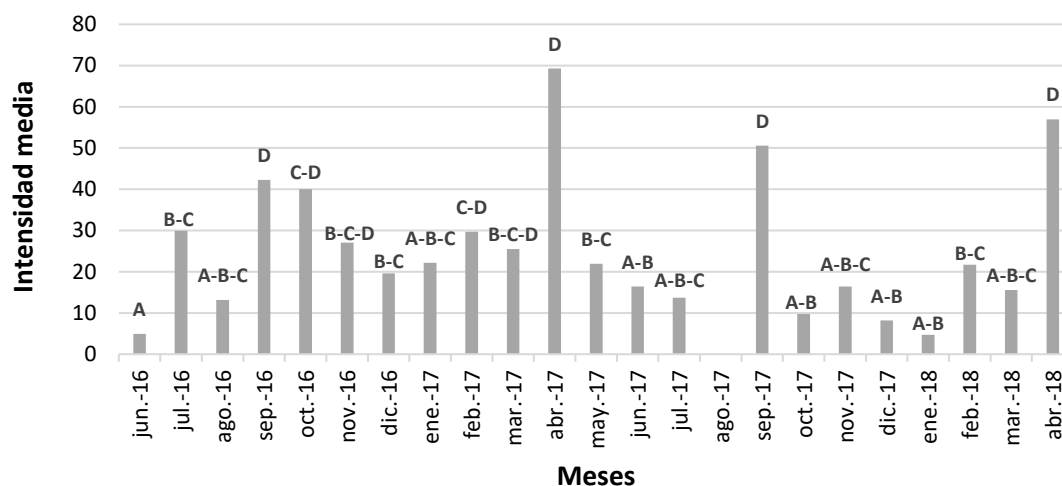


Figura 7. Intensidad media de infección de *Ascogregarina culicis* en los distintos meses en la localidad de Eldorado, Misiones.

La comparación de la intensidad media de infección entre diferentes sitios de muestreo también mostró diferencias significativas ($H=12,11$; $p=0,0023$), permitiendo separar con una prueba de comparaciones, viviendas familiares con la IM más alta, del resto de los sitios (Fig. 8).

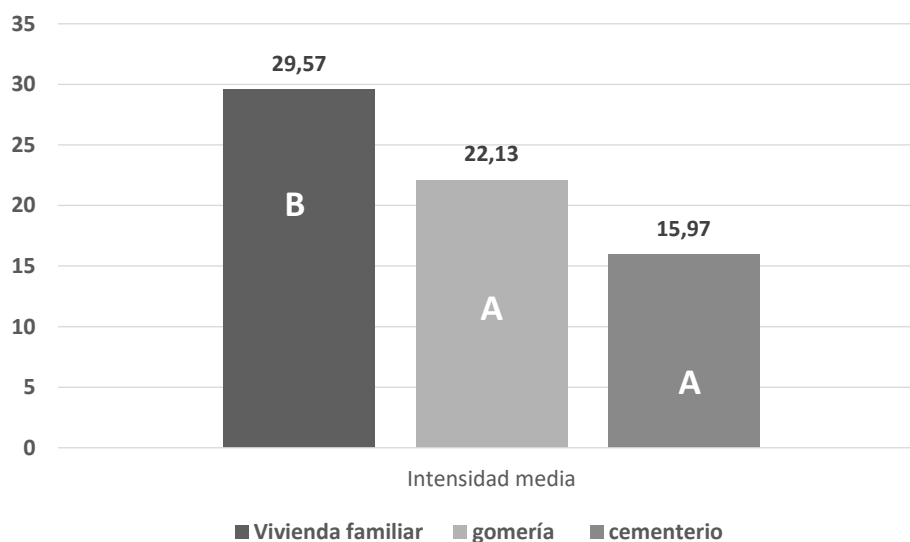


Figura 8. Intensidad media de infección de *Ascogregarina culicis* en diferentes sitios de la localidad de Eldorado, Misiones. Los sitios que poseen la misma letra no son significativamente diferentes entre sí.

Entre los diferentes tipos de recipientes, la comparación de intensidad media de infección mostró diferencias significativas ($H= 23,18$ $p= 0,0031$).

La prueba de comparaciones reveló que la diferencia de intensidad está dada por un lado, entre los recipientes de plástico y chatarra (que mostraron los valores más altos de IM) con respecto al resto; y por otro lado entre tanque de agua y recipiente de cemento (con el valor más bajo de IM) y el resto de los recipientes (Fig. 9).

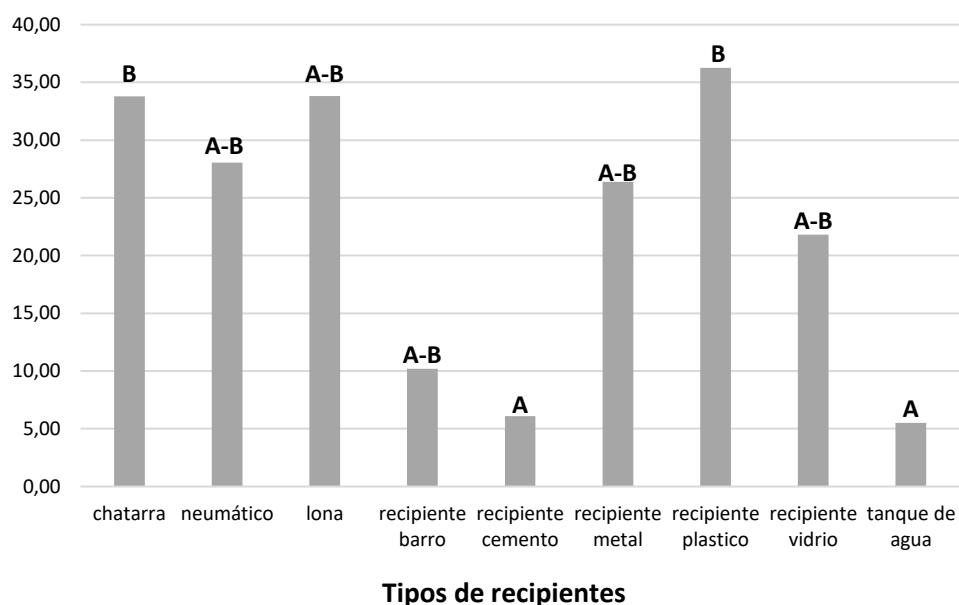


Figura 9. Intensidad media de infección de *Ascogregarina culicis* en diferentes tipos de recipientes de la localidad de Eldorado, Misiones.

La temperatura media del agua de los criaderos analizados durante el período de muestreo fue de 22,86 °C (DE 6,02). La temperatura del agua del criadero y el número de trofozoítos que se encontraron en el intestino medio presentaron una correlación negativa ($rs = -0,11$), con un valor p no significativo ($p = 0,36$).

El análisis multivariado considerando el sitio en el cual se encontraba el criadero (vivienda familiar, gomería, cementerio), mostró que la mayor temperatura media (25,89 °C) que fue registrada en los recipientes del cementerio se corresponde con la IM más baja (15,97) y la menor temperatura media (21,49 °C) detectada en los recipientes del sitio vivienda familiar se corresponde con una mayor IM (29,57) (Fig. 10).

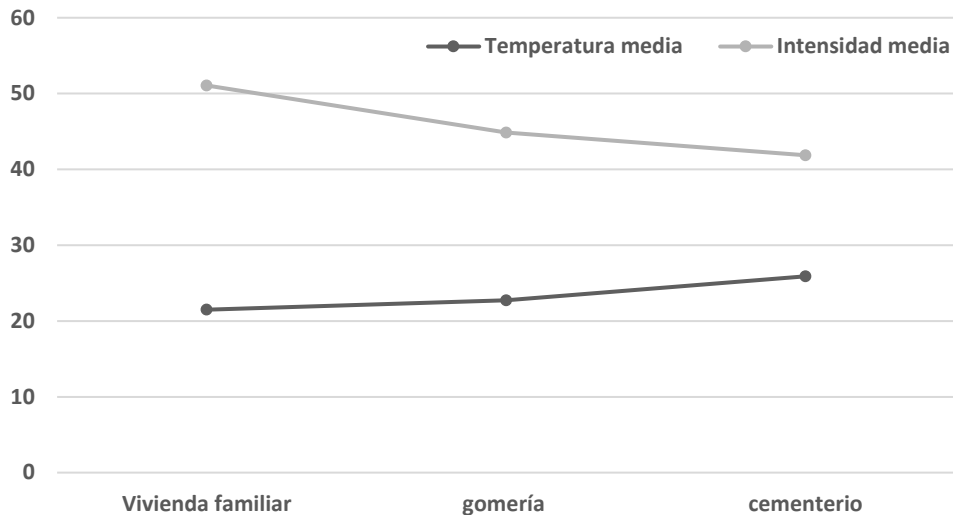


Figura 10. Temperaturas medias de criaderos e intensidad media de *Ascogregarian culicis* en los diferentes sitios de muestreo en Eldorado, Misiones.

A partir del análisis de conglomerados se conformó un dendograma donde se reconocen dos grupos, uno formado por el sitio cementerio (3), y otro formado por los sitios vivienda familiar (1) y gomería (2) (Fig. 11).

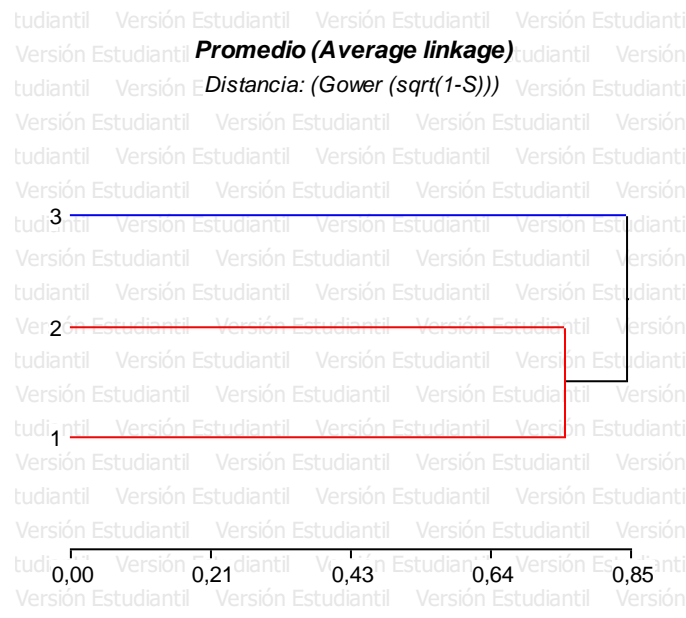


Figura 11. Dendograma comparando los sitios de muestreo de *Aedes aegypti* infectado con *Ascogregarina culicis* en Eldorado, Misiones. 1: vivienda familiar, 2: gomería, 3: cementerio.

Al considerar los tipos de recipientes el análisis de agrupamiento separó dos grupos, dejando al recipiente 9 (tanque de agua) separado del resto. Este recipiente se caracterizó por presentar un gran volumen de agua y la temperatura más baja (21,7°C). Con respecto al otro grupo, se pueden observar categorías aisladas y un subgrupo conformado por los recipientes 5 (metal) y 2 (plásticos), que poseen una temperatura media del agua similar (23,79 y 24,23°C respectivamente), ubicación bajo sombra parcial y presencia en los criaderos de *Ae.albopictus*. Muy próximo al subgrupo 5-2 se encuentra la categoría 4 (recipiente de lona), que presentó temperatura media de 24,3°C (Fig. 12).

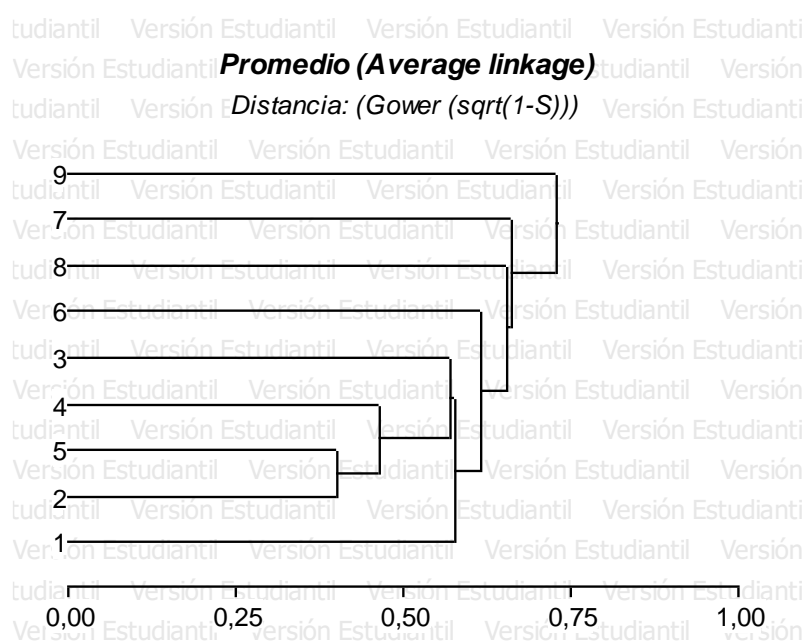


Figura 12. Dendrograma comparando los diferentes tipos de recipientes de cría de *Aedes aegypti* infectado con *Ascogregarina culicis* en Eldorado, Misiones. 1: neumático, 2: recipientes plásticos, 3: recipientes de vidrio, 4: lona, 5: recipientes de metal, 6: chatarra; 7: recipientes de cerámica, 8: recipientes de cemento, 9: tanque de agua.

Ascogregarina taiwanensis

Se diseccionaron 188 larvas de *Ae.albopictus*, con una prevalencia de infección total de 37,23 % (N= 70). El número total de inmaduros de *Ae. albopictus* colectados durante el período de muestreo fue de 1456 individuos.

El análisis de las prevalencias mensuales arrojó como resultado una diferencia significativa entre los meses de estudio, (Chi cuadrado de Pearson =87,93; $p < 0,0001$). Los meses de mayor prevalencia de infección fueron diciembre de 2016 con 78,57 % (N=14), junio de 2017 con 68,42 (N= 19), octubre de 2017 con 83,33 % (N= 5), enero 90 % (N=9) y marzo de 2018, 100 % (N=10)

(Fig. 13). Es importante aclarar que durante el período de muestreo no fue posible coleccionar *Ae. albopictus* todos los meses.

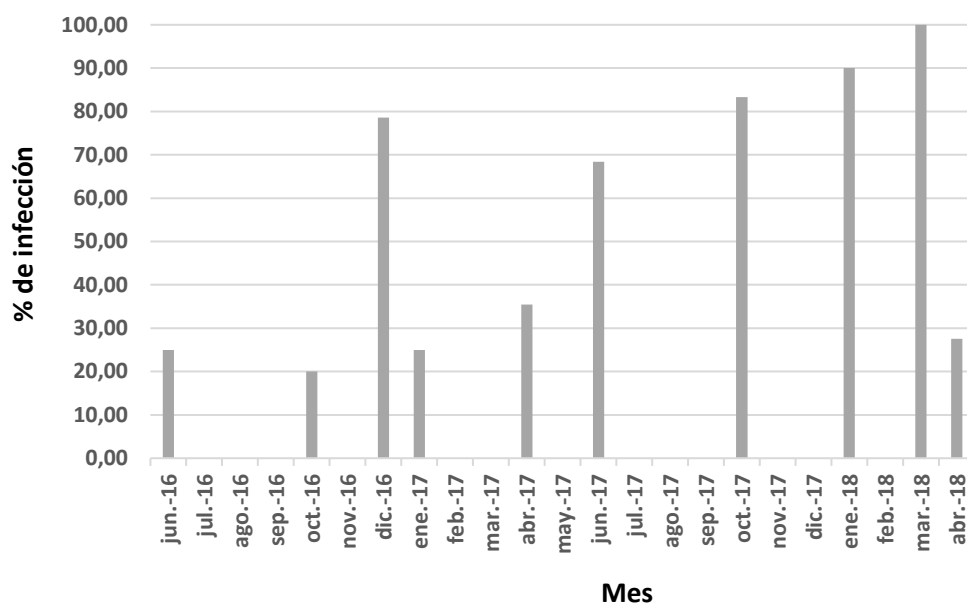


Figura 13. Prevalencia de infección mensual de *Ascogregarina taiwanensis* infectando *Aedes albopictus* en la localidad de Eldorado, Misiones.

Con respecto a las prevalencias por estación durante el período de muestreo se encontraron diferencias significativas (Chi cuadrado de Pearson =29,36; p= 0,0003). Las estaciones con mayor prevalencia fueron otoño de 2017 con un porcentaje de infección de 58,53 % (N= 24) y verano 17/18 con 90 % (N= 9) (Fig. 14).

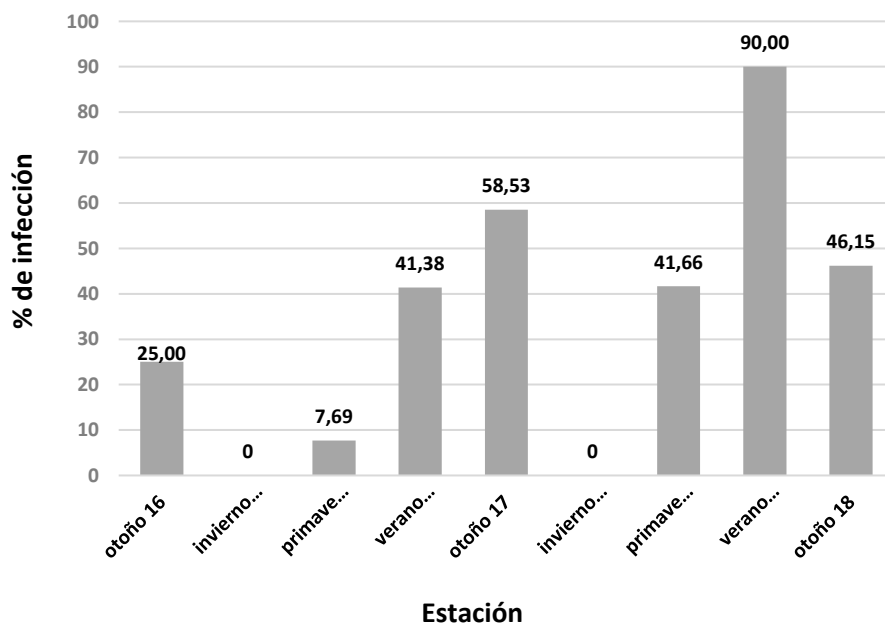


Figura 14. Prevalencia de infección estacional de *Ascogregarina taiwanensis* infectando *Aedes albopictus* en la localidad de Eldorado, Misiones.

La comparación de la prevalencia entre los sitios urbanos (viviendas familiares, gomerías y cementerios) no reveló diferencias significativas en la prevalencia de infección (Chi cuadrado de Pearson =0,07; p=0,9661).

La intensidad de infección varió de 1 a 327 trofozoítos por larva. La intensidad media de todo el período de muestreo fue de 43,95 (DE 63,93). La comparación entre las IM mensuales arrojó diferencias significativas (H= 26,15; p= 0,0010). Los meses de mayor IM fueron octubre de 2016 con 73,00 (DE 37,16), junio de 2017 con 54,85 (DE 64,88) y marzo de 2018 con IM de 111,00 (DE 97,90) (Fig. 15).

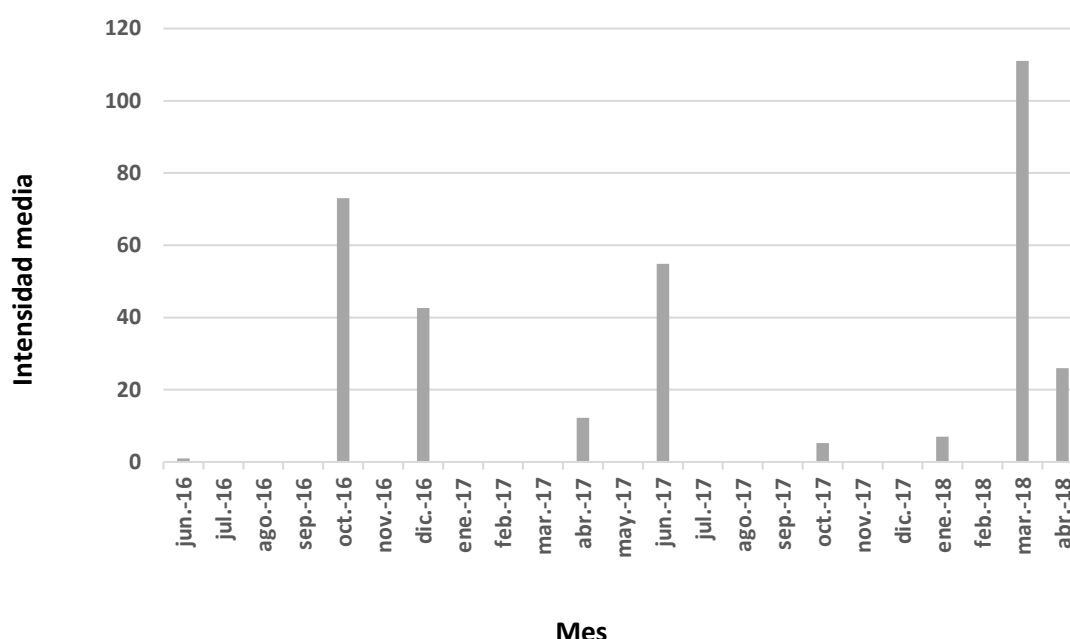


Figura 15. Intensidad media de infección mensual de *Ascogregarina taiwanensis* en la localidad de Eldorado, Misiones.

Al comparar la IM entre sitios se observaron diferencias significativas (H= 14,54; p= 0,0007). Sin embargo al realizar una prueba de comparaciones no se pudieron evidenciar esas diferencias. Probablemente el valor H muy pequeño no permita revelar diferencias con este análisis.

Se realizó luego una prueba de comparaciones y se observó que el criadero neumático (con la IM más alta) se diferenció significativamente de los recipientes de cemento, plástico y metal con el menor IM (Fig. 16).

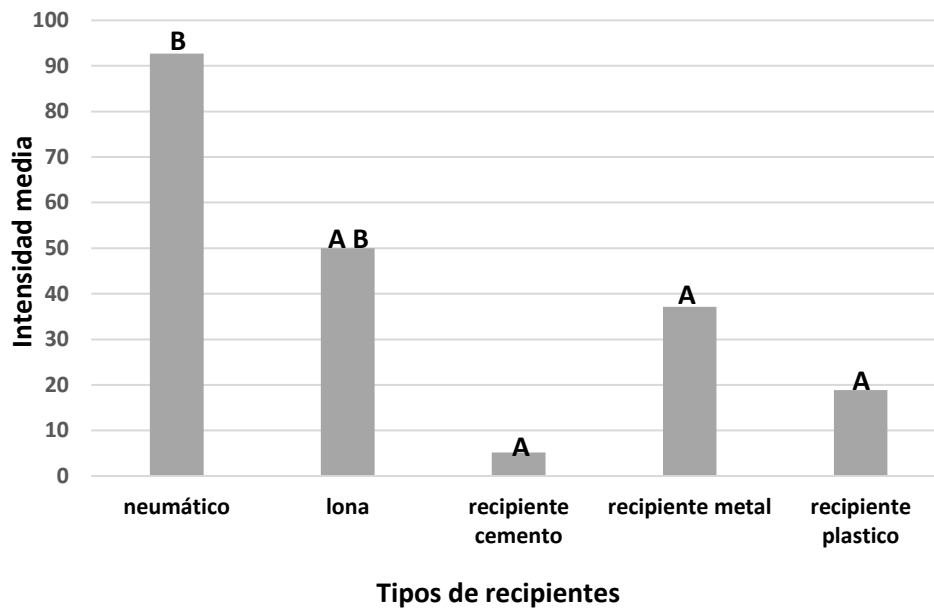


Figura 16. Intensidad media de infección de *Ascogregarina taiwanensis* en diferentes tipos de recipientes de la localidad de Eldorado, Misiones.

La temperatura media del agua de los criaderos analizados durante el período de muestreo fue de 22,85 (DE 4,07), no encontrándose ninguna relación entre el número medio de trofozoítos de *A. taiwanensis* y la temperatura del criadero ($r_s = -0,10$ $p = 0,75$).

Al realizar los análisis multivariados considerando el sitio en el cual se encontraba el criadero (vivienda familiar, gomería, cementerio) se observó que la mayor temperatura media (24,83°C) encontrada para cementerio se corresponde a la IM más baja (14,46). La menor temperatura media (21,20°C) de gomería se corresponde con una mayor IM (73,00) (Fig. 17).

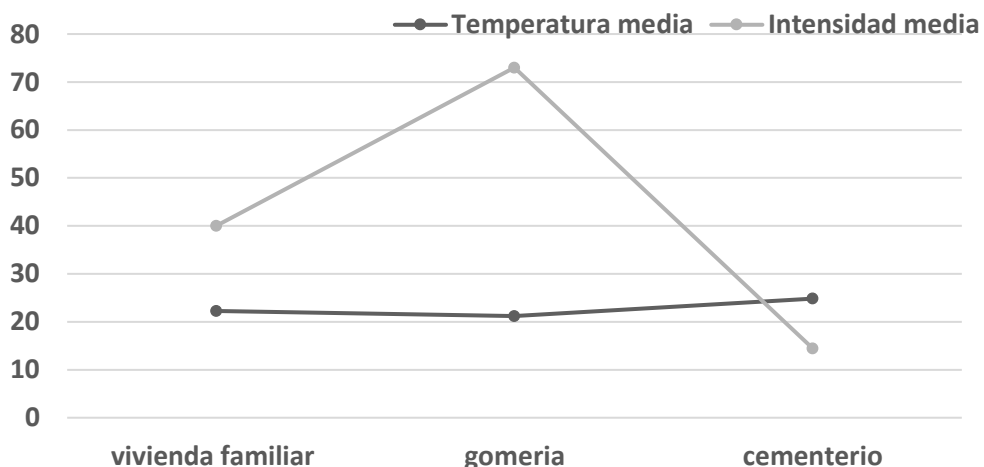


Figura 17. Temperatura media de criaderos e intensidad media de *Ascogregarina taiwanensis* en los diferentes sitios de muestreo en Eldorado, Misiones.

A partir del análisis de conglomerados se conformó un dendograma donde se reconocen dos grupos, uno formado por el sitio gomería (2), y otro formado por los sitios vivienda familiar (1) y cementerio (3) (Fig. 18).

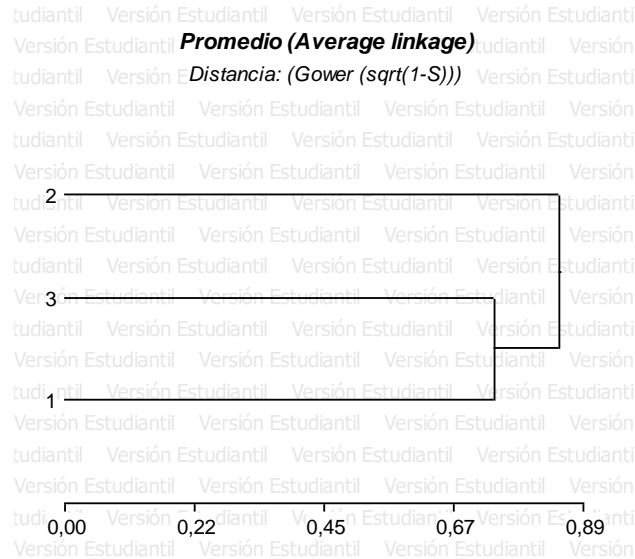


Figura 18. Dendograma comparando los sitios de muestreo de *Aedes albopictus* infectado con *Ascogregarina taiwanensis* en Eldorado, Misiones. 1: vivienda familiar, 2: gomería, 3: cementerio.

Con respecto a los diferentes recipientes en los cuales se encontró *Ae. albopictus* parasitado con *A. taiwanensis* el análisis de agrupamiento separó dos grupos, por un lado los recipientes 1 (neumáticos) y 8 (cemento) que poseen una temperatura media similar (6,75 y 7,1°C, respectivamente) y en ambos tipos se encontró además *Ae. aegypti*; y en el otro grupo el tipo de recipiente 2 (plástico) con el recipiente 5 (metal) con una temperatura media e intensidad de infección similares, además de estar ubicados mayoritariamente a la sombra parcial. A este grupo se une posteriormente el tipo de recipiente 4 (lona) (Fig. 19).

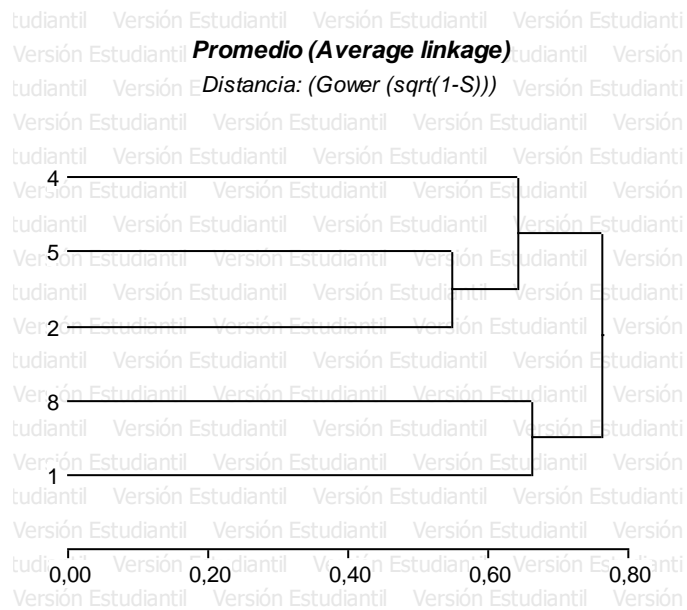


Figura 19. Fenograma comparando los diferentes tipos de recipientes de cría de *Aedes albopictus* infectado con *Ascogregarina taiwanensis* en Eldorado, Misiones 1: neumáticos, 2: recipientes plásticos, 4: lona, 5: recipientes de metal, 8: recipientes de cemento.

Identificación molecular de *Ascogregarina*

Extracción de ADN y amplificación por PCR

La amplificación con las cebadores AU, AT y AC permitió revelar en un gel de agarosa al 2% productos de amplificación con tamaños similares a los esperados, aunque no se logró obtener bandas únicas ni bien definidas. Incluso luego de cambiar las condiciones de ciclado (Fig. 20).

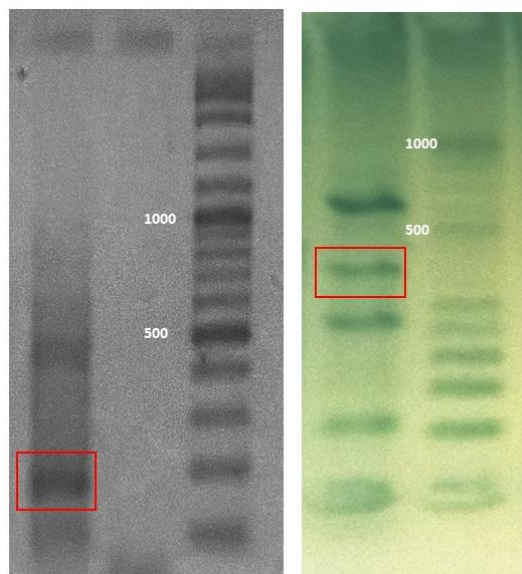


Figura 20. Gel de agarosa al 2%. A) ADN de *Aedes aegypti* infectado con *Ascogregarina culicis* amplificado con los cebadores AU-AC. B) ADN de *Ae. albopictus* infectado con *A. taiwanensis* amplificado con cebadores AU-AT.

Análisis de secuencias y relación filogenética

Los productos de PCR purificados y enviados a secuenciar a *Macrogen Inc.* (Seúl, Corea del Sur) permitieron obtener fragmentos de 200 pb de la muestra correspondiente a *Ae. aegypti* y 180 pb de la muestra de *Ae. albopictus*. En la Fig. 21 se observa el cromatograma de la muestra de *Ae. aegypti*. La secuenciación de la muestra de *Ae. albopictus* permitió recuperar un fragmento mucho menor al esperado, donde además solo fue posible obtener la secuencia en sentido *forward*.



Figura 21 .Cromatograma del producto de PCR amplificado proveniente de *Aedes aegypti*.

El alineamiento de la secuencia 214 AC 400 proveniente de intestino de *Ae. aegypti* con la base de datos del NCBI a través del programa BLAST demostró que el aislado presenta identidad en un porcentaje del 96 al 100% con otras secuencias de *A. culicis*. Este fragmento obtenido permite confirmar la presencia de *A. culicis* en intestino de *Ae. aegypti*. Posteriormente se realizó el alineamiento con las otras secuencias de *A. culicis* y *A. taiwanensis* obtenidas de la base de datos (Fig. 22).

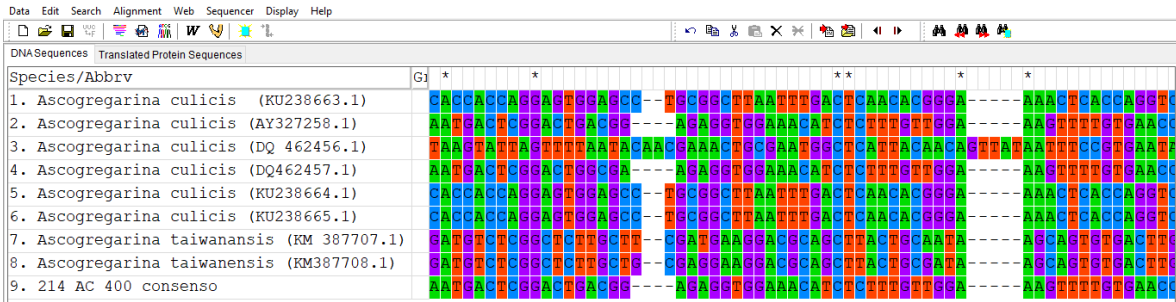


Figura 22 .Interface del programa MEGA. Se observa el resultado para el alineamiento de la secuencia obtenida y las disponibles en la base de datos de regiones de ARN ribosomal de *Ascogregarina culicis* y *A. taiwanensis*.

Las topologías de los árboles filogenéticos construidos mediante el método de *Máximum Likelihood* y *Neighbor – Joining* resultaron similares. En la fig. 23 se muestra el fenograma con método *Máximum Likelihood*. Se puede observar que *A. culicis* de Argentina se agrupa junto a la cepa de Colombia, y ambas están relacionadas con la cepa de Vietnam.

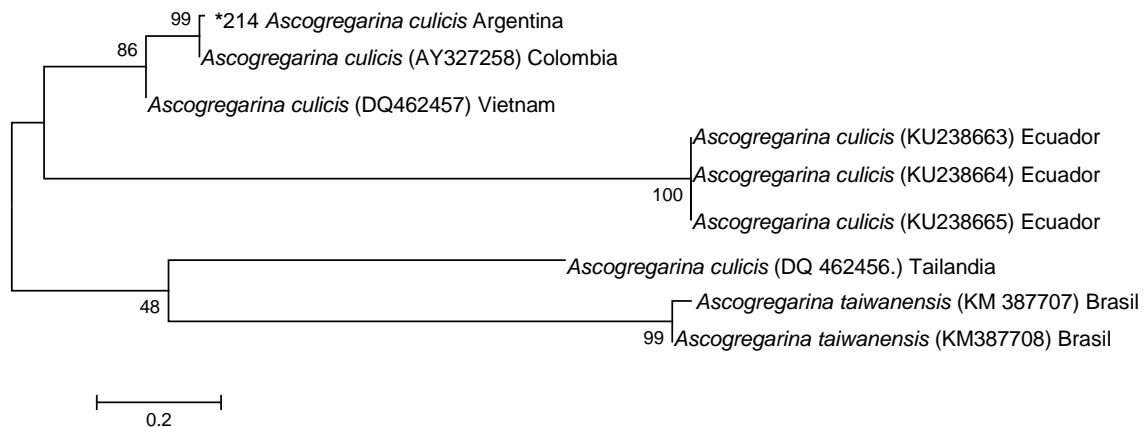


Figura 23. Árbol filogenético de secuencias de *Ascogregarina culicis* y *A. taiwanensis* utilizando los métodos de *Máximum Likelihood*. El porcentaje de *bootstrap* se muestra sobre las ramas.

* Secuencia obtenida en el estudio.

La secuencia obtenida de la muestra de intestino de *Ae. albopictus* cuyo tamaño luego de la amplificación fue de 450 pb, resultó ser un fragmento de apenas 180 pb, y únicamente en sentido *forward*, con el cual no fue posible confirmar su identidad.

DISCUSIÓN

Los reportes de *A. culicis* y *A. taiwanensis* infectando a *Ae. aegypti* y *Ae. albopictus* en América del Sur y en Argentina son de recientes investigaciones, dado que el interés en su estudio tomó relevancia a partir de la introducción de *Ae. albopictus* al continente americano a finales del siglo XX (Vezzani & Wisnivesky, 2006; Passos & Tadei, 2008, Albicócco & Vezzani, 2009; Pereira, 2015; Prophiro *et al.* 2017). A partir de la presente investigación se reporta por primera vez la infección de larvas de *Ae. albopictus* por *A. taiwanensis* en Argentina, de esta forma contribuye al conocimiento de la bionomía de esta especie de mosquito exótica de introducción relativamente reciente en la región. Con respecto a *Ae. aegypti* es el primer trabajo realizado en una población del norte de Argentina, y simpátrica con *Ae. albopictus*.

Las investigaciones relacionadas con la morfología de estos parásitos han revelado diferencias en los aislados geográficos, por ejemplo el tamaño de trofozoítos de *A. culicis* de Eldorado, Misiones con 82,22 μm ($\pm 21,69$) de largo y 28,27 μm ($\pm 9,61$) de ancho resulta más pequeño que el informado por Reyes-Villanueva (2001) de 275- 280 μm de largo y 19-20 μm de ancho para una cepa de Florida (EEUU). En Buenos Aires, Argentina Dellapé *et al.* (2005) realizaron el primer reporte de *Ae. aegypti* infectado con *A. culicis* encontrando un tamaño más pequeño al hallado en el presente estudio (59,3 μm de largo y 12,1 μm de ancho). Posteriormente en el 2009, Albicócco & Vezzani informaron tamaños de *A. culicis* de 76,88-116,56 μm de largo y 11,6-12,4 μm de ancho. Otros trabajos evidencian también diferencias de tamaño. La primera descripción hecha por Lien & N Levine (1980) para aislados de Taiwán, se refiere a los trofozoítos como alargados y rectos, midiendo 170 μm de largo y 26 μm de ancho en la parte anterior. Esta variabilidad en el tamaño se debe en gran parte a las condiciones del hospedador, pudiendo también ser explicada por tratarse de diferentes aislados geográficos (Reyes-Villanueva, Becnel & Butler, 2001).

La morfología de los trofozoítos de *A. taiwanensis* encontrados en el tracto digestivo de *Ae. albopictus* coincide con la descripción realizada por Reyes-Villanueva *et al.* (2001) que permite su identificación, sin embargo el tamaño encontrado de 81,60 μm ($\pm 20,4$) de largo y un ancho de 40,04 μm ($\pm 13,24$) resultó más pequeño que los descritos por Lien & Levin (1980) de 234 μm de

largo y 32 µm de ancho para un aislado de Taiwán. Estas diferencias de tamaño de los trofozoítos pueden deberse a la temperatura del agua (Chen & Yang, 1996). El aspecto de los mismos no concuerda con la descripción realizada en 1980 por Lien & Levine, donde los describe como elongados.

La prevalencia de infección encontrada para *A. culicis* en *Ae. aegypti* y *A. taiwanensis* en *Ae. albopictus* fue 34,81 % y 37,23 %, respectivamente. La prevalencia de infección hallada para *A. taiwanensis* de 37,23 % es mucho más baja que la registrada para Florida (EEUU) y Manaus (Brasil) que varía entre el 68-100 % y 21-93,5% respectivamente.

El porcentaje de infección de *A. culicis* es mucho más bajo que el registrado en Brasil (78-95%) para larvas colectadas en trampas realizadas con neumáticos (Passos & Tadei, 2008) y en Estados Unidos donde los valores de prevalencia de infección varían entre 50 – 70% (Blackmore *et al.*, 1995; Barret *et al.*, 1971), pero es mayor con respecto a lo reportado previamente en Argentina para larvas colectadas en cementerio (19,9%) y hembras (21,2%) de poblaciones de *Ae. aegypti* de clima templado (Vezzani & Wisnivesky, 2006; Albicócco & Vezzani, 2009).

Las ascogregarinas fueron encontradas parasitando a *Ae. aegypti* durante todo el período de muestreo. Es importante destacar la presencia de *Ae. aegypti* durante todo el año en el norte del país, lo cual permitiría una infección más establecida y mayores prevalencias; diferente a la situación de Buenos Aires donde no hay estadios larvarios ni pupas durante la época invernal, obligando al parásito a subsistir en forma de ooquistes en los recipientes de cría y su presencia en el hospedador sólo se registra de enero a mayo (Albicócco & Vezzani, 2009). De allí que en el presente estudio las mayores prevalencias encontradas para los meses de febrero de 2017, septiembre de 2016, abril de 2018, julio de 2017, diciembre de 2016, octubre de 2017 y marzo de 2018 podrían relacionarse con la abundancia del hospedador. En Buenos Aires, los patrones de abundancia estacional de *Ae. aegypti* son similares a los de prevalencia estacional de *A. culicis* (Vezzani & Wisnivesky, 2006).

Es importante destacar que en el presente trabajo las larvas diseccionadas fueron colectadas de diversos tipos de sitios dentro del ejido urbano y de una variedad de recipientes (plásticos, metal, vidrio, huecos de tumba, neumáticos de diversos tamaños). Creemos que la prevalencia de

infección obtenida en Eldorado, en relación a otras halladas en Sudamérica (Passos & Tadei, 2008; Vezzani & Wisnivesky, 2006; Albicocco & Vezzani, 2009) donde únicamente realizaron colectas en un solo tipo de sitio o en trampas de un solo material (ej: neumáticos), representaría un registro más completo de las infecciones por estos parásitos.

La intensidad y la prevalencia de infección de *A. culicis* y *A. taiwanensis* varía considerablemente entre diferentes regiones del mundo e inclusive dentro de una misma región geográfica como se evidenció en el trabajo de Passos & Tadei (2008) en la región Amazónica de Brasil. Para la localidad de Eldorado, Misiones, la intensidad de infección de *A. culicis* fue de 1 a 250 trofozoítos por larva, menor a la registrada para Manaus de 1 a 582 (Passos & Tadei, 2008). La intensidad media total fue de 28,94 (DE 35,78), significativamente más alta que la reportada por Albicocco & Vezzani (2009) para la región templada de Argentina, que reportan 9 por larva. Blackmore *et al.*, (1995) para Florida (EE UU) encontraron valores que varían de 1 a 486 trofozoítos y valores de IM para *Ae. aegypti* de 52,5 y para *Ae. albopictus* de 33,5, diferente a lo hallado en el presente trabajo donde la IM para *Ae. aegypti* fue de 28,94 y para *Ae. albopictus* de 43,95.

Con respecto al análisis mensual, la intensidad media más alta de *A. culicis* se observó en los meses de abril y septiembre en ambos años, probablemente porque al tratarse de otoño y primavera las temperaturas no son tan elevadas ni tan bajas para afectar la supervivencia de los parásitos y sus hospedadores. En la localidad de Eldorado la temperatura media del agua registrada en los recipientes de cría para otoño fue de 22,96°C, con una mínima de 16,90°C y una máxima de 29,70°C. Para la primavera la temperatura media fue de 22,75°C, con mínima de 14,10°C y máxima de 31,90°C. Las altas temperaturas y la reducción de la viabilidad es apoyada por el trabajo de García *et al.*(1994) quienes encontraron una intensidad de infección más baja para *A. taiwanensis* en los meses de verano donde las temperaturas son mayores (21,4°C a la sombra, con una mínima de 20,9°C y máxima de 24,2°C; y 31,2°C al sol, con una mínima de 24,5°C y una máxima de 34,4°C). La IM más baja se registró para el mes de junio, este hecho probablemente estaría relacionado con la disminución de la abundancia del hospedador.

Los recipientes más favorables, donde se registraron IM más altas, fueron chatarra, que se encontraban principalmente en viviendas familiares y recipientes plásticos, distribuidos en viviendas familiares y cementerio. Nuevamente en las viviendas familiares se detectó la mayor IM respecto a los otros sitios estudiados, asociada a la menor temperatura registrada en los criaderos allí presentes. La IM más baja registrada en cementerio podría relacionarse con el hecho que en ese sitio, los recipientes (floreros de diferentes materiales y huecos de tumba) al estar en su mayoría totalmente expuestos al sol y ser mayoritariamente de vidrio, las temperaturas del agua alcanzadas en verano oscilaron entre 29,4° C y 30,9°C, por ello la intensidad de infección fue menor para ambos parásitos. Resultados similares fueron reportados por Albicocco & Vezzani (2009) que encontraron prevalencias más altas en sitios sombreados. En Eldorado, Misiones los rangos de temperatura del agua para cada estación tomados el día de captura de inmaduros para invierno oscilaron entre 5,4 y 25,9°C, y para verano entre 21,7 y 34,9°C.

Con respecto a las estaciones, otoño y verano fueron las de mayor porcentaje de infección, coincidente con la abundancia del mosquito hospedador y diferente a lo reportado para Florida por Garcia *et al.*(1994) donde la prevalencia se mantiene alta durante todas las estaciones del año. En Misiones, *Ae. albopictus* mayoritariamente es encontrado en ambiente natural o semi-natural, lo cual brindaría protección de la luz solar directa a los criaderos, impidiendo su desecación, en consecuencia los ooquistes no estarían expuestos a condiciones desfavorables, como los criaderos de *Ae. aegypti* que mostraron prevalencia de infección más baja, de 34,81 %.

La intensidad de infección de *A. taiwanensis* hallada de 1 a 327 trofozoítos por larva fue similar a la informada por Passos & Tadei (2008) en Manaus, Brasil de 1 a 382.

Con respecto a los sitios con mayor intensidad de infección para *A. taiwanensis* se observó que eran aquellos en los que los recipientes estaban más protegidos de la luz del sol (viviendas familiares y gomerías), o por la misma naturaleza del tipo de criadero (neumáticos, recipientes en desuso, macetas, recipientes de agua de mascotas) y que por lo tanto con temperatura de agua menores.

Esta relación entre la viabilidad de ascogregarinas y la temperatura podría explicarse desde dos tipos de relaciones, por un lado los trofozoítos no sobreviven más allá de alrededor de 40° C (Mourya, *et al.*, 2004); y en segundo lugar se ha demostrado que la viabilidad de los ooquistes disminuye a partir de los 35,6°C (McCray *et al.*, 1970).

Con respecto a la identificación molecular las variaciones de secuencia en el rDNA de SSU, ITS1 y / o ITS2 son útiles para la identificación de diferentes especies de Ascogregarinas (Roychoudhury *et al.*, 2007). Sin embargo el tamaño de las secuencias obtenidas en el presente estudio no fue suficientemente grande para analizar si existen diferencias con otros aislados geográficos de Ascogregarina disponibles en la base de datos. Únicamente permitió confirmar que la secuencia recuperada del intestino de *Ae. aegypti* corresponde a *A. culicis*.

Las similitudes por aproximación que se observan en el árbol filogenético entre secuencias de *A. culicis* de Argentina y Colombia en el árbol podrían o no tener correlación con distancias geográficas de las muestras. Otra hipótesis para explicar la aproximación estaría relacionada con el hecho de compartir el haplotipo H entre *Ae. aegypti* de Argentina y Colombia, que además resulta ser el más abundante en ambas poblaciones (Carrozza *et al.* 2016).

Es importante continuar con estudios experimentales de los efectos del protozoo de esta región de Argentina sobre el fitness de *Ae. albopictus* debido a la IM alta hallada y la baja abundancia del mosquito, ya que ha sido probado en otras partes del mundo que la infección por *A. taiwanensis* en *Ae. albopictus* puede prolongar el desarrollo larval, disminuir el tamaño del adulto y afectar la fecundidad de las hembras (Tseng, 2017). Además el porcentaje de infección encontrado en *Ae. albopictus* mayor a *Ae. aegypti* hace pensar que pasaron suficientes años para que la población de *A. taiwanensis* esté totalmente establecida, y que los 20 años que han transcurrido desde la introducción de *Ae. albopictus* a nuestro país han sido suficientes para que se supere la etapa de escape a los parásitos propuesta por Tseng (2017) donde el mosquito en sus primeros años de colonización de una nueva área no estaría parasitado en porcentajes altos por el protozoo, lo que le daría cierta ventaja reproductiva inter e intrapoblacional para aumentar su número. Sin embargo la baja abundancia de *Ae. albopictus* en Argentina estaría indicando que este mecanismo de ventaja

reproductiva no ha sido suficiente para que *Ae. albopictus* se transforme en una especie invasiva aún.

Los resultados hallados abren posibilidades de continuar con nuevas líneas de investigación que permitan caracterizar molecularmente a las *Ascogregarinas* halladas y realizar ensayos experimentales, para evaluar la susceptibilidad de *Ae. albopictus* y *Ae. aegypti* a este parásito y su rol sobre el *fitness* en poblaciones simpátricas de ambas especies de mosquitos en Argentina.

BIBLIOGRAFÍA

- Albicócco, A. P., & Vezzani, D. (2009). Further study on *Ascogregarina culicis* in temperate Argentina: Prevalence and intensity in *Aedes aegypti* larvae and pupae. *Journal of Invertebrate Pathology*, 101(3), 210–214. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2009.05.003>
- Blackmore, M. S., Scoles, G. A., & Craig, G. B. (1995). Parasitism of *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus* (Diptera: Culicidae) by *Ascogregarina* spp. (Apicomplexa; Lecudinidae) in Florida. *Journal of Medical Entomology*, 32(6), 847–852.
- Bush, A. O., Lafferty, K. D., Lotz, J. M., & Shostak, A. W. (1997). Parasitology Meets Ecology on Its Own Terms: Margolis et al. Revisited. *The Journal of Parasitology*, 83(4), 575. <https://doi.org/10.2307/3284227>
- Chen, W. J., & Yang, C. H. (1996). Developmental Synchrony of *Ascogregarina taiwanensis* (Apicomplexa: Lecudinidae) within *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae). *Journal of Medical Entomology*, 33(2), 212–215. <https://doi.org/10.1093/jmedent/33.2.212>
- Carrozza, M & Rubio-Palis, F. H. (2016). Genetic structure of Latin American *Aedes aegypti*. *Boletín de Malariología y Salud Ambiental*, LVI (I), 53–62.
- Comiskey, N. M., Lowrie, R. C., & Wesson, D. M. (1999). Role of habitat components on the dynamics of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) from New Orleans. *Journal of Medical Entomology*, 36(3), 313–320. <https://doi.org/10.1093/jmedent/36.3.313>
- Dellapé, M.E.; Marti, G.A.; Tranchida, M.C., and García J.J. (2005). First record of *Aedes aegypti* (L.) (DIPTERA: CULICIDAE) infected by the parasite *Ascogregarina culicis* (ROSS) (Apicomplexa: LECIDINIDAE) in Argentina. *Etmol.Vect. Universidade Gama Filho*, 12(1), 111–115.
- Erthal, J. A., & Soghigian, J. S. and Livdahl, T. (2012). Life Cycle Completion of Parasite *Ascogregarina taiwanensis* (Apicomplexa : Lecudinidae) in Non-Native Host *Ochlerotatus japonicus* (Diptera : Culicidae), 49(5), 1109–1117.

García JJ, Fukuda T, Becnel J. J. (1994). Seasonality, prevalence and pathogenicity of the gregarine *Ascogregarina taiwanensis* (Apicomplexa: LECUDINIDAE) in mosquitoes from Florida, 10(3), 413–418.

Golstein, P., & Kroemer, G. (2007). Cell death by necrosis: towards a molecular definition. Trends in Biochemical Sciences, 32(1), 37–43. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2006.11.001>

Holt, R. D. & Lawton, J.H. (1994). The Ecological Consequences of Shared.

Natural Enemies. Annu. Rev. Ecol. Syst., 25, 495–520.

Thompson, J. D.; Gibson T.J.; Plewniak, F; Jeanmougin F and Higgins D.G. (1997). The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. Nucleic Acids Research, 25(24), 4876–4882. <https://doi.org/10.1093/nar/25.24.4876>

Lantova, L., & Volf, P. (2014). Mosquito and sand fly gregarines of the genus *Ascogregarina* and *Psychodiella* (Apicomplexa: Eugregarinorida, Aseptatorina) - Overview of their taxonomy, life cycle, host specificity and pathogenicity. Infection, Genetics and Evolution, 28, 616–627. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2014.04.021>

McCray, E. M., Fay, R. W., & Schoof, H. F. (1970). The Bionomics of *Lankesteria culicis* and *Aedes aegypti*, 16, 42–53.

Morales, M. E., Ocampo, C. B., Cadena, H., Copeland, C. S., Termini, M., and Wesson, D. M. (2005). Differential identification of *Ascogregarina* species (Apicomplexa: Lecudinidae) in *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) by polymerase chain reaction. The Journal of Parasitology, 91(6), 1352–1356. <https://doi.org/10.1645/GE-442R.1>

Morrison, D. A. (2009). Evolution of the Apicomplexa: where are we now? Trends in Parasitology, 25(8), 375–382. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2009.05.010>

Mourya, D. T., Yadav, P., & Mishra, A. C. (2004). Effect of temperature stress on immature stages and susceptibility of *Aedes aegypti* mosquitoes to Chikungunya virus. Am. J. Trop. Med. Hyg 70(4), 346–350.

Munstermann, L. E., & Wesson, D. M. (1990). First record of *Ascogregarina taiwanensis* (Apicomplexa: Lecudinidae) in North American *Aedes albopictus*. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 6(2), 235–243. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2370530>

Passos, R. A. d., & Tadei, W. P. (2008). Parasitism of *Ascogregarina taiwanensis* and *Ascogregarina culicis* (Apicomplexa: Lecudinidae) in larvae of *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) from Manaus, Amazon region, Brazil. *Journal of Invertebrate Pathology*, 97(3), 230–236. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2007.09.008>

Prophiro, J. S., Pereira, T. N., de Oliveira, J. G., Dandolini, G. W., da Silva, M. A. N., & da Silva, O. S. (2017). *Ascogregarina taiwanensis* infection in *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in Santa Catarina, South Brazil. *Revista Da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 50(2), 235–238. <https://doi.org/10.1590/00378682-0048-2016>

Reeves, W. K., & Mcculloughb, S. D. (2002). Laboratory Susceptibility of *Wyeomyia smithii* (Diptera: Culicidae) to *Ascogregarina taiwanensis* (Apicomplexa: Lecudinidae), 49(5), 391–392.

Reyes-Villanueva, F., Becnel, J. J., & Butler, J. F. (2001). Morphological traits for distinguishing extracellular gamonts of *Ascogregarina culicis* and *Ascogregarina taiwanensis* in *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 77(3), 227–229. <https://doi.org/10.1006/jipa.2001.5018>

Reyes-Villanueva, F., Becnel, J. J., & Butler, J. F. (2003). Susceptibility of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* larvae to *Ascogregarina culicis* and *Ascogregarina taiwanensis* (Apicomplexa: Lecudinidae) from Florida. *Journal of Invertebrate Pathology*, 84(1), 47–53. [https://doi.org/10.1016/S0022-2011\(03\)00119-8](https://doi.org/10.1016/S0022-2011(03)00119-8)

Reyes-Villanueva, F., Garza-Hernandez, J. A., Garcia-Munguia, A. M., Howard, A. F. V., Ortega-Morales, A. I., Adeleke, M. A., & Rodriguez-Perez, M. A. (2013). *Aedes albopictus* in northeast Mexico: An update on adult distribution and first report of parasitism by *Ascogregarina taiwanensis*. *Journal of Vector Borne Diseases*, 50(3), 202–205.

Roychoudhury, S., Isawa, H., Hoshino, K., Sasaki, T., Saito, N., Sawabe, K., & Kobayashi, M. (2007). Comparison of the morphology of oocysts and the phylogenetic analysis of four *Ascogregarina* species (Eugregarinidae: Lecudinidae) as inferred from small subunit ribosomal DNA sequences. *Parasitology International*, 56(2), 113–118. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2006.12.006>

Roychoudhury, S., & Kobayashi, M. (2006). New Findings on the Developmental Process of *Ascogregarina taiwanensis* and *Ascogregarina culicis* in *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti*. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 22(1), 29–36. [https://doi.org/10.2987/8756971x\(2006\)22\[29:nfotdp\]2.0.co;2](https://doi.org/10.2987/8756971x(2006)22[29:nfotdp]2.0.co;2)

Juliano, S. (1998). Species Introduction and Replacement among Mosquitoes : Interspecific Resource Competition or Apparent Competition ?. *Ecology*, 79(1), 255–268.

Lien, S. & Levine, N. (1980). Three new species of *Ascocystis* (Apicomplexa, Lecudinidae) from Mosquitoes. *Journal of Protistology*, 27(2), 147–151.

Sulaiman, I. (1992). Infectivity and pathogenicity of *Ascogregarina culicis* (Eugregarinida: Lecudinidae) to *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Journal of Medical Entomology*, 29(1), 1–4. <https://doi.org/10.1093/jmedent/29.1.1>

Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., & Kumar, S. (2013). MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30(12), 2725–2729. <https://doi.org/10.1093/molbev/mst197>

Templeton, T. J., Enomoto, S., Chen, W. J., Huang, C. G., Lancto, C. A., Abrahamsen, M. S., & Zhu, G. (2010). A genome-sequence survey for *Ascogregarina taiwanensis* supports evolutionary affiliation but metabolic diversity between a Gregarine and *Cryptosporidium*. *Molecular Biology and Evolution*, 27(2), 235–248. <https://doi.org/10.1093/molbev/msp226>

Tseng, M. (2004). Sex-specific response of a mosquito to parasites and crowding. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 271(Suppl_4), S186–S188. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2003.0139>

Tseng, M. (2007). Ascogregarine parasites as possible biocontrol agents of mosquitoes. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 23(sup 2), 30–34.

[https://doi.org/10.2987/8756971X\(2007\)23\[30:APAPBA\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.2987/8756971X(2007)23[30:APAPBA]2.0.CO;2)

Tseng, M. (2017). The effect of parasitism and interpopulation hybridization on *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) fitness. *Journal of Medical Entomology*, 54(5), 1236–1242. <https://doi.org/10.1093/jme/tjx075>

Vezzani, D., & Wisnivesky, C. (2006). Prevalence and seasonality of *Ascogregarina culicis* (Apicomplexa: Lecudinidae) in natural populations of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) from temperate Argentina. *Journal of Invertebrate Pathology*, 91(3), 183–187. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2005.12.001>

Nunes Pereira, T. (2015). Presença de *Ascogregarina* spp. em populações de *Aedes* (*Stegomyia*) spp. no estado de Santa Catarina e aspectos da interação parasito-hospedeiro em *Aedes aegypti*. Tesis de Maestría. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas de Saúde, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Porto Alegre, BR-RS, 44 pp

Capítulo 4:

Consideraciones y perspectivas sobre la relación parásito- hospedador

En el presente trabajo uno de los objetivos proyectaba la búsqueda de relaciones entre los parásitos hallados, las abundancias de mosquitos y las características de los criaderos. Este objetivo no se pudo realizar debido a que se requieren estudios experimentales para determinar los efectos de cada microorganismo sobre las abundancias de *Aedes aegypti* y *Ae. albopictus*.

***Wolbachia* en *Aedes albopictus* de Misiones**

En un estudio previo realizado en Misiones por Chuchuy *et al.* (2018) donde fueron estudiadas las características biológicas de la especie, encontraron una tasa de eclosión de huevos baja, lo que condujo a una tasa de crecimiento negativa. Una explicación para este hecho y la baja abundancia de *Ae. albopictus* en Misiones llevó a relacionar estos acontecimientos con el estado de infección con *Wolbachia*. La incompatibilidad citoplasmática provocada por la bacteria, que no se encontraría fijada en la población (prevalencias del 88,3%), se ve reflejada en la baja tasa de eclosión de huevos, probable efecto de la misma, al detener el desarrollo de embriones tempranos. En poblaciones hospedadoras que incluyen individuos infectados y no infectados, las hembras no infectadas reducen el éxito reproductivo de la población al ser incompatible con los machos infectados (Dobson *et al.*, 2004). Por otro lado los machos superinfectados expresan altos niveles de IC en cruzamientos con hembras no infectadas o infectadas por una sola cepa (Bourtzis *et al.*, 2014).

En nuestro estudio la prevalencia encontrada de 76,89 %, también estaría indicando que la bacteria no ha logrado superar el umbral de infección requerido para invadir totalmente una población. En la Tabla 1 se observa la abundancia del mosquito hospedador y las prevalencias mensuales de esta bacteria a partir de detecciones individuales del segundo año de muestreo.

Tabla 1. Prevalencias mensuales de *Wolbachia* y abundancias de *Aedes albopictus* en la localidad de Eldorado, Misiones

Mes	Prevalencia de <i>Wolbachia</i>	Abundancia de <i>Aedes albopictus</i>
May. 2017	50,00 %	129
Jun. 2017	72,50 %	177
Jul. 2017	80,95 %	42
Ago. 2017	90,00 %	24
Sep 2017	100,00 %	62
Oct. 2017	56,41 %	64
Nov. 2017	65,71 %	149
Dic. 2017	67,74 %	87
Ene. 2018	81,81 %	255
Feb. 2018	85,71 %	379
Mar. 2018	85,00%	467
Abr. 2018	86,04 %	190

Los fenotipos hallados permitirían especular con la penetración de la incompatibilidad citoplasmática, si bien el estudio fue realizado con larvas, los resultados obtenidos en cuanto a la prevalencia de cada cepa son similares al estudio realizado en Iguazú por Chuchuy *et al.* (2018) para mosquitos adultos.

Las prevalencias mensuales obtenidas para la ciudad de Eldorado muestran una oscilación durante el año de muestreo (Tabla 2), destacándose un valor de prevalencia del 100 % en el mes de septiembre, con descensos en los siguientes meses a valores cercanos al 60 %. Un evento que podría haber provocado esta variación tan marcada, sería el recambio poblacional experimentado por *Ae. albopictus* en invierno. La población de *Ae. albopictus* de la ciudad de Eldorado posiblemente experimentó un cuello de botella, donde el número de individuos disminuyó drásticamente producto de las condiciones adversas de temperatura y precipitación de los primeros meses de invierno de 2017 (veranillo, sequía y heladas), sumado a la duración del ciclo de vida de vida de *Ae. albopictus*, más largo que el ciclo de *Ae. aegypti*. Durante junio y julio, donde se registró una sequía de 45 días en la zona, en los diferentes sitios de muestreo se observaron abundantes recipientes secos al inicio del invierno, incluyendo la sequía de una laguna temporaria del ambiente natural visitado

mensualmente. En agosto luego de las abundantes lluvias registradas los recipientes contenían agua, aunque sin larvas. En septiembre nuevamente se registraron dos semanas sin lluvias previas al muestreo. Por estos motivos, se especula que la alta prevalencia de *Wolbachia* en el mes de septiembre no sea producto del azar y se deba a la supervivencia de los individuos infectados por sobre los no infectados, que al estar en baja abundancia en los criaderos, las hembras infectadas presentarían un mayor fitness (Gavotte *et al.*, 2010); con una consecuente mayor descendencia infectada. Respaldando esta especulación también se encuentran los datos aportados por Dobson *et al.* (2002, 2004), donde explica que las hembras infectadas con infecciones simples o superinfectadas presentan una mayor vida media y altas tasas de producción y eclosión de huevos respecto a las hembras no infectadas

Tabla 2. Prevalencias mensuales de cada cepa de *Wolbachia* y porcentaje de larvas sin infección.

Mes	wAlbA	wAlbB	wAlbA/ wAlbB	Nº	Prevalencia total	I.C. 95%
May. 2017	0,00 %	3,85 %	42,15 %	26	50,00 %	± 0,19217
Jun. 2017	0,00 %	12,5 %	60,00 %	40	72,5 %	± 0,13837
Jul. 2017	0,00 %	14,28 %	66,66 %	21	80,94 %	± 0,16798
Ago. 2017	0,00 %	30,00 %	60,00 %	10	90,00 %	± 0,18594
Sep. 2017	0,00 %	0,00 %	100,00 %	29	100,00 %	-
Oct. 2017	2,56 %	7,70 %	46,15 %	39	56,41 %	± 0,155619
Nov. 2017	0,00 %	22,86 %	42,86 %	35	65,72 %	± 0,15725
Dic 2017	0,00 %	19,35 %	48,39 %	31	67,74 %	± 0,1645
Ene. 2018	0,00 %	15,91 %	65,91 %	44	81,82 %	± 0,113983
Feb. 2018	0,00 %	30,61 %	55,10 %	49	85,71 %	± 0,09798
Mar. 2018	0,00 %	67,50 %	17,5 %	40	85,00 %	± 0,130173
Abr. 2018	0,00 %	44,19 %	41,86 %	43	86,05 %	± 0,10358

I.C.: intervalo de confianza al 95 %

En este contexto y a partir de los resultados preliminares del presente estudio de prevalencias mensuales de *Wolbachia* en una población natural de *Ae. albopictus*, se propone como pasos siguientes la comparación de los parámetros adaptativos como fecundidad, fertilidad, supervivencia, proporción

de sexos e incompatibilidad citoplasmática entre colonias experimentales de *Ae. albopictus* provenientes de Eldorado, infectadas y libres de *Wolbachia*. Se centrarán los esfuerzos en llevar a cabo los cruzamientos de hembras superinfectadas walbA/walbB con machos con infección simple, en donde los datos bibliográficos son discrepantes. Además se plantea la realización de estudios de prevalencia durante un año más a fin de determinar si las oscilaciones observadas en la prevalencia se repiten bajo un mismo patrón.

Ascogregarina culicis* y *A. taiwanensis

En nuestro trabajo se determinaron las prevalencias y la intensidad de infección de ambos parásitos. Para determinar los efectos de cada uno de ellos sobre el fitness del mosquito, y su posible influencia en las abundancias de larvas se requieren estudios experimentales en laboratorio. En la tabla 3 se muestran las abundancias de cada mosquito y las prevalencias de ambas ascogregarinas.

Tabla 3. Abundancias mensuales de *Aedes aegypti* y *Ae. albopictus* y las prevalencias de *Ascogregarina culicis* y *A. taiwanensis* de la localidad de Eldorado, Misiones.

Mes	Abundancia <i>Ae. aegypti</i>	Prevalencia <i>A. culicis</i>	Abundancia <i>Ae. albopictus</i>	Prevalencia <i>A. taiwanensis</i>
Jun. 2016	178	24,39	8	25,00
Jul. 2016	293	35,21	13	0,00
Ago. 2016	139	9,52	1	sd
Sep. 2016	197	61,53	58	0,00
Oct. 2016	468	15,79	16	20,00
Nov. 2016	594	39,13	17	sd
Dic. 2016	910	55,84	182	78,57
Ene. 2017	956	25,00	53	25,00
Feb. 2017	984	63,63	98	0,00
Mar. 2017	1143	16,00	256	0,00
Abr. 2017	838	22,06	355	35,48
May. 2017	1010	39,65	129	sd
Jun. 2017	509	29,78	177	68,42
Jul. 2017	76	58,33	42	0,00
Ago. 2017	295	0,00	24	sd
Sep. 2017	655	37,25	62	0,00
Oct. 2017	1202	53,06	64	83,33
Nov. 2017	1278	36,00	149	sd
Dic. 2017	1517	20,00	87	sd
Ene. 2018	1712	6,00	255	90,00
Feb. 2018	1447	21,15	379	sd
Mar. 2018	1240	47,62	467	100
Abr. 2018	1131	58,57	190	27,58

sd: sin datos para ese mes.

En este estudio aunque no se pudo obtener la secuencia completa de *A. taiwanensis*, las diferencias morfológicas nos permitieron con facilidad la identificación de las mismas en los ejemplares diseccionados. No obstante, se continuará con la caracterización molecular de las dos especies halladas y se procederá al aislamiento de cada una de ellas según protocolos descritos por Lacey (2012). Una vez obtenidos los macerados con ooquistes de cada especie de gregarina se procederá a infectar colonias de *Aedes aegypti* y *Ae. albopictus* libres de parásitos, para evaluar el efecto de la patogenicidad de cada uno de los

parásitos en sus hospedadores naturales y en infecciones cruzadas. Esto permitirá avanzar en el conocimiento de los mismos como factores de regulación natural de las poblaciones e incluso, dependiendo de los resultados, como metodologías alternativas de biocontrol.

Conclusión general y Perspectivas futuras

La provincia de Misiones es considerada un área de riesgo de transmisión de Dengue, Fiebre Amarilla, Zika y Chikungunya, donde además se encuentran los dos vectores, *Aedes aegypti* y *Ae. albopictus*. La relevancia de los estudios de mosquitos de importancia sanitaria a escala regional adquiere aún más protagonismo cuando se desconocen aspectos de su distribución estacional y espacial a diferentes escalas, como en el caso de *Ae. albopictus*, el cual desde su detección en 1998 mantiene restringida su distribución a esta provincia.

Como resultado del presente trabajo se ampliaron los conocimientos en cuanto a la distribución temporal y a escala de paisaje, para estas dos especies vectores que viven en simpatria en Eldorado, aportando datos inéditos para el país y la región. Otro aspecto abordado y poco estudiado fue la presencia de parásitos en ambas especies; y la prevalencia de la bacteria endosimbionte *Wolbachia* en *Ae. albopictus*, la cual posee la capacidad de manipular la reproducción de sus huéspedes. Se ha llegado a las siguientes conclusiones:

Desde el punto de vista epidemiológico en cuanto a las virosis transmitidas por *Ae. aegypti* la presencia de este culícido registrada todo el año mantiene alto el riesgo de circulación y transmisión de arbovirus, principalmente el dengue.

Los ambientes urbanos ofrecen una amplia variedad de microambientes, distribuidos en domicilio y espacios públicos, por ejemplo los cementerios de la ciudad de Eldorado, que a pesar de las campañas municipales realizadas representan un foco importante de proliferación de mosquitos, ya que la mayor cantidad de recipientes con *Ae. aegypti* y con ambas especies de culícidos viviendo en simpatria se hallaron en ese sitio.

Se han encontrado una amplia variedad de hábitats artificiales principalmente lonas, juguetes plásticos, bebederos de mascotas, neumáticos, chatarras, frascos, tanques de agua, botellas de vidrio y plástico ubicados en cementerios, viviendas familiares y gomerías; y naturales como hueco de árbol y tocón de tacuara, capaces de albergar las dos especies de *Aedes* spp..

Se determinó la coexistencia de ambas especies en el área de estudio con predominio de las abundancias de *Aedes aegypti* sobre *Ae. albopictus*, debido a que si bien se observan algunas características diferenciales de selección de ambientes que permitirían la segregación de las mismas en los

diferentes sitios estudiados, como ser *Ae. aegypti* más abundante en sitios con mayor urbanización y *Ae. albopictus* en sitios menos disturbados y con abundante vegetación circundante, es necesario continuar los estudios sobre las interacciones competitivas de las dos especies en los diferentes hábitats larvales hallados, dado que fueron registradas en una gran variedad de criaderos y en muchos de ellos coexistiendo. Asimismo es necesario continuar con los estudios que permitan conocer qué factores ambientales o climáticos pueden estar afectando la supervivencia de los huevos de ambas especies en diferentes estaciones del año, con mayor o menor humedad relativa ambiente, en época seca o lluviosa y profundizar en estudios que permitan dilucidar la diferente supervivencia larval en las diferentes épocas del año, dado que se ha observado en este estudio que *Ae. aegypti* es más abundante en el verano y *Ae. albopictus* en el otoño.

Se detectaron dos cepas de *Wolbachia* en *Ae. albopictus*, *wAlbA* y *wAlbB*, con ejemplares superinfectados y con simple infección, donde la prevalencia más alta fue para la doble infección. La prevalencia total de *Wolbachia* en la población estudiada fue 76,65 %, siendo uno de los pocos estudios realizado en larvas, mostrando que en inmaduros se dan también fenotipos de superinfección y simple infección, mayoritariamente por la cepa *wAlbB*. Las detecciones para *Ae. aegypti* resultaron negativas.

Una de las probables razones, aunque no la única, para explicar la baja abundancia de *Ae. albopictus* en la ciudad de Eldorado, sería la incompatibilidad citoplasmática, dado los efectos sobre la fertilidad que este fenómeno genera en las poblaciones. Dicho fenómeno se produciría entre cruzamientos de hembras sanas con machos infectados; y la posibilidad de que el cruzamiento entre individuos superinfectados y con infección simple también genere infertilidad (suponiendo los mismos fenotipos en larvas y adultos). Sumado al efecto del ambiente sobre el *fitnees* de los individuos no infectados e infectados de la población, los cuales deben ser profundizados con estudios posteriores.

Se reporta por primera vez para Argentina la infección por *Ascogregarina taiwanensis* en *Ae. albopictus*, con una prevalencia de 37,23 % y una intensidad de 1 a 327 trofozoitos por larva. Para *Ae. aegypti* la prevalencia de *A. culicis* fue de 34,81 %, y la intensidad de 1 a 250 trofozoitos por larva. Para ambos

protozoos se realizó la descripción morfológica del trofozoito. No se han detectado infecciones cruzadas.

El estudio preliminar de los microorganismos de *Ae. aegypti* y *Ae. albopictus* del presente trabajo derivó en nuevas líneas de investigación próximas a realizarse en el equipo de trabajo, entre ellas ensayos experimentales con *Wolbachia* en colonias de *Ae. albopictus*, que permitirá comparar los parámetros adaptativos como fecundidad, fertilidad, supervivencia, proporción de sexos e incompatibilidad citoplasmática entre colonias provenientes de Eldorado, infectadas y libres de *Wolbachia*.