

“DETECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE *FLAVIVIRUS*
DETECTADOS EN MOSQUITOS DEL GÉNERO *CULEX* COLECTADOS EN AMBIENTE
URBANO Y SEMIURBANO DE RESISTENCIA, CHACO”

Por

Lic. Ornela Sofia Stechina¹

Directora: Marina Stein¹

Co-Director: Luis Adrián Díaz^{2,3}

¹Área de Entomología. Instituto de Medicina Regional.

Universidad Nacional del Nordeste

²Laboratorio de Arbovirus. Instituto de Virología “Dr. JM. Vanella”. Facultad de
Ciencias Médicas. Universidad Nacional de Córdoba

³Instituto de Investigaciones Biológicas y Tecnológicas – IIBYT. CONICET. Córdoba



FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES Y AGRIMENSURA

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL NORDESTE

CORRIENTES, ARGENTINA

2019

DEFENSA ORAL Y PÚBLICA

Lugar y Fecha:

Calificación:

Tribunal

Firma:

Aclaración:

Firma:

Aclaración:

Firma:

Aclaración:

*“Un científico en su laboratorio no es un simple técnico
también es un niño que se enfrenta a fenómenos naturales
que lo impresionan como si fueran cuentos de hadas”.*

Marie Curie (1867-1934)

AGRADECIMIENTOS

A mi directora, la Dra. Marina Stein, no solo por brindarme un espacio en el Laboratorio de Entomología y la posibilidad de hacer el doctorado, sino también por todo lo aprendido. Por su acompañamiento durante todos estos años y por estar tan presente en las últimas etapas de este trabajo, sé que no habrá sido fácil, y por mucho mucho más, gracias.

A mi co-director, el Dr. Adrián Díaz, por aceptar ser parte de este trabajo y recibirme con calidez en Córdoba todas las veces que fue necesario, por brindarme parte de su conocimiento en las correcciones y observaciones del manuscrito.

Al Dr. Eduardo Etchepare por colaborar con el análisis estadístico y porque además me recibió cada vez que necesité ayuda.

A la Dra. Marta Contigiani, por ser mi directora de beca doctoral y por acompañarme en este proceso de aprendizaje.

A los integrantes del Laboratorio de Arbovirus del Instituto de Virología por la amabilidad, enseñanza y por darme un espacio para poder trabajar.

A mis compañeros del Laboratorio de Entomología del Instituto de Medicina Regional, especialmente a Carla por darme una mano con los análisis estadísticos, las tablas de especies y la determinación de los mosquitos. A Javi por facilitarme los shapefile y los papiros (su tesoro máspreciado), y esas charlas en las que nunca entendí de que me hablaba. A Grise por esa hermosa corrida en gel!

A mi compañera de laboratorio y amiga Janinna ("la tia Yan") por ser tan generosa y amable (si no fuera por vos ya estaría muerta de hambre). Pero más que nada agradecerle las charlas que me hicieron muy bien, por los ratos libres y por ser tan amorosa conmigo.

A Martín, el mejor compañero de vida que me podría haber tocado, por acompañarme durante todo el proceso, escucharme y estar a mi lado cada vez que fue necesario, gracias.

A Matilda, que vino en mitad del proceso a ponerle más color a todo, gracias hija por el amor y paciencia, y por aguantar tantos días de ausencia de mama.

A mis papas, eternamente agradecida, porque sin ellos este sueño prácticamente no hubiera sido posible. Por darle amor a Matilda y hacer que no extrañe tanto todas las veces que la cuidaron para que yo pueda escribir o viajar.

A mis hermanas Georgina y Tania, por ser tan geniales como son, es una bendición y alegría compartir mi vida con ustedes. Gracias por darme siempre ánimo, y abrazar mis miedos para que yo pueda cumplir mis sueños.

A mi suegra Nansy, por acompañar mis sueños y ayudarme en el cuidado de Matilda.

A mis tías de Córdoba, especialmente a mi tía Meli por recibirme en su casa con enorme calidez y amor, que hicieron que las estadías en Córdoba no sean tan difíciles sin Matilda.

A mi prima Anabella, una de las personas más amorosas que conozco, por buscarme cada vez que me perdía en Rio Ceballos, por ser tan atenta conmigo y estar pendiente de todo, y lo más lindo, las charlas y los paseos que tuvimos durante mis estadías en Córdoba.

A mis amigas, especialmente a Lucila, Naty y Mare, por ayudarme y acompañarme en este proceso.

Infinito agradecimiento a todas las personas que de alguna u otra manera han contribuido para que en este momento esté presentando el manuscrito de la tesis doctoral.

RESUMEN.....	1
CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN GENERAL	
GÉNERO FLAVIVIRUS.....	7
Estructura viral.....	7
Morfología.....	7
Ácido nucleico.....	8
Carbohidratos, lípidos y proteínas.....	8
Replicación viral y traducción del genoma.....	10
TAXONOMÍA DEL GÉNERO.....	12
FLAVIVIRUS TRANSMITIDOS POR MOSQUITOS (MBV)	13
Infección por <i>Flavivirus</i> en mosquitos.....	13
Transmisión biológica.....	13
Otras vías de transmisión biológica.....	16
Transmisión no Biológica.....	17
Transmisión directa.....	17
Transmisión Mecánica.....	18
Taxonomía y bionomía de mosquitos vectores de <i>Flavivirus</i> en Argentina	19
Mosquitos de la tribu Aedini.....	19
Subgénero <i>Stegomyia</i>	20
MBV transmitidos por mosquitos del género <i>Aedes</i> (<i>Stegomyia</i>).....	21
YFV.....	21
DENV.....	22
Mosquitos de la tribu Culicini.....	23
Subgénero <i>Culex</i>	24
MBV transmitidos por mosquitos del género <i>Culex</i> (<i>Culex</i>)	25
WNV.....	25
SLEV.....	25
FLAVIVIRUS ESPECÍFICOS DE INSECTOS (ISF).....	26
Antecedentes en América y Argentina de ISF.....	28
BIBLIOGRAFÍA.....	31
CAPÍTULO II: CARACTERIZACIÓN DE LA COMUNIDAD DE CULÍCIDOS Y SU VARIACIÓN ESPACIO-TEMPORAL EN DIFERENTES AMBIENTES DE LA CIUDAD DE RESISTENCIA, CHACO	
INTRODUCCIÓN.....	39
Objetivos.....	42
MATERIALES Y MÉTODOS.....	43
Descripción del área de estudio.....	43

Sitios de muestreo.....	45
Ambiente Urbano.....	45
Sitio Regimiento.....	46
Sitio Vialidad.....	47
Ambiente semiurbano.....	48
Sitio Monte Alto.....	48
Captura e identificación de mosquitos adultos.....	49
Análisis de los datos.....	51
Métodos para evaluar de diversidad alfa.....	51
Métodos para evaluar la diversidad beta.....	53
Categoría de dominancia.....	53
Patrones de actividad temporal y variables climáticas.....	53
RESULTADOS.....	55
Comunidad de culícidos de diferentes ambientes de la ciudad de Resistencia.....	55
Patrones de actividad temporal de culícidos y variables climáticas.....	63
DISCUSIÓN.....	71
BIBLIOGRAFÍA.....	79
CAPÍTULO III: <i>FLAVIVIRUS</i> PRESENTES EN DIFERENTES AMBIENTES DE LA CIUDAD DE RESISTENCIA Y SU DINÁMICA ESPACIO-TEMPORAL	
INTRODUCCIÓN.....	85
Objetivos.....	86
MATERIALES Y MÉTODOS.....	87
Obtención del ARN viral, transcripción reversa y detección por PRC-Nested.....	87
Análisis de las secuencias e identificación molecular.....	88
Cálculo de la Tasa Mínima de Infección.....	89
Análisis filogenético.....	89
RESULTADOS.....	90
Identificación molecular de los <i>Flavivirus</i> detectados en mosquitos.....	90
Dinámica espacio-temporal de los ISF detectados y Tasa Mínima de Infección.....	92
Análisis filogenético.....	94
Infección natural con SLEV.....	96
DISCUSIÓN.....	97
BIBLIOGRAFÍA.....	103
CAPÍTULO IV: CONSIDERACIONES FINALES.....	107

ANEXO

CAPÍTULO II

Tabla 2: Abundancia total de especies mosquitos por sitio de colecta, desde otoño 2013 a primavera 2015.....	115
--	-----

Tabla 5: Abundancia de especies mosquitos por estación durante los dos períodos analizados en los tres sitios estudiados (primavera 2013 hasta otoño 2015).....	117
---	-----

CAPÍTULO III

Tabla 3: Resultado de los modelos de distancia calculados en MEGA X.....	119
--	-----

ÍNDICE DE TABLAS

CAPÍTULO I

Figura 1: Función de cada una de las proteínas tanto estructurales como no estructurales	9
--	---

CAPÍTULO II

Tabla 1: Cronograma de colectas de culícidos realizadas en la ciudad de Resistencia.....	50
--	----

Tabla 3: Riqueza específica, abundancia de individuos, Índice de Shannon-Wiener y de diversidad de Jost.....	56
--	----

Tabla 4: Estimador de riqueza no paramétrico ACE.....	57
---	----

Tabla 5: Índice de complementaridad.....	61
--	----

CAPÍTULO III

Tabla 1: Valores de la Tasa Mínima de Infección (TMI) y porcentaje de los pools positivos por especie y tipo de ambiente estudiado.....	91
---	----

ÍNDICE DE FIGURAS

CAPÍTULO I

Figura 1: Reconstrucciones microscópicas tridimensionales crioelectrónicas de partículas inmaduras (izquierda) y maduras (derecha) de un aislamiento del virus <i>Dengue</i>	7
--	---

Figura 2: Expresión y estrategia de procesamiento de la poliproteína de <i>Flavivirus</i>	9
---	---

Figura 3: Infección y replicación de los <i>Flavivirus</i> en la célula hospedadora.....	11
--	----

Figura 4: Diagrama de la anatomía del mosquito indicando las diferentes barreras de infección, diseminación y transmisión.....	14
--	----

CAPÍTULO II

Figura 1: Mapa ubicando la provincia de Chaco y el área de estudio.....	44
---	----

Figura 2: Mapa de Resistencia con la ubicación de los sitios de muestreo.....	45
---	----

Figura 3: Ubicación del sitio de muestreo Regimiento.....	46
---	----

Figura 4: Ubicación del sitio de muestreo Vialidad.....	47
---	----

Figura 5: Ubicación del sitio de muestreo Monte Alto.....	49
Figura 6: Rarefacción de la abundancia en los ambientes de Vialidad (VN), Regimiento (Rg) y Monte Alto (MA).....	57
Figura 7: Curva de acumulación de especies de “mosquitos” basado en el estimador de riqueza no paramétrico ACE. S Mean: promedio de la riqueza de especies.....	59
Figura 8: Curvas de abundancia para las especies capturadas en tres ambientes de la ciudad de Resistencia, Chaco.....	60
Figura 9: Análisis de cluster utilizando el índice de Jaccard, con el método del ligamiento no ponderado (UPGMA).....	62
Figura 10: Variación mensual de la precipitación acumulada, la temperatura media, máxima y mínima desde octubre 2013 hasta junio 2015, en el área de estudio.....	63
Figura 11: Abundancia de mosquitos expresadas en Log ₁₀ (n+1) presentes en las diferentes estaciones climáticas de los dos períodos analizados.....	65
Figura 12: Abundancia de especies (expresadas en Log ₁₀) del género <i>Culex</i> subgénero <i>Culex</i> por estación climática en los diferentes sitios de muestreo.....	69
CAPÍTULO III	
Figura 1: Pools de especies positivas para Flavivirus y TMI por estación durante los dos periodos de análisis en los diferentes ambientes.....	93
Figura 2: Árbol filogenético de los Flavivirus basado en 62 nucleótidos del gen NS5.....	95

Los objetivos de la presente tesis fueron: 1) caracterizar la comunidad de culícidos en dos tipos de ambientes con diferente grado de modificación antrópica de la ciudad de Resistencia; 2) describir los patrones de actividad temporal de las especies halladas y su asociación con las variables ambientales; 3) detectar *Flavivirus* en mosquitos con especial atención a las especies del género *Culex*, subgénero *Culex* y 4) describir los patrones espacio-temporal de estos virus en los dos ambientes estudiados.

De manera estacional desde otoño 2013 hasta primavera 2015, en tres sitios, dos de ellos en el ambiente urbano (Vialidad y Regimiento) y uno en el ambiente semiurbano (Monte Alto), se realizaron muestreos de mosquitos adultos, utilizando trampas de luz tipo CDC adicionadas con CO₂. El análisis de la composición de la comunidad de culícidos permitió, por un lado, evidenciar la presencia de especies como *Culex quinquefasciatus* y *Aedes aegypti*, implicadas en la transmisión de *Flavivirus* entre ellos virus *Saint Louis Encephalitis* (SLEV) y virus *Dengue*. Se observó una mayor diversidad y riqueza de especies de Culicidae en el ambiente semiurbano. En este sentido este ambiente podría jugar un rol importante en el mantenimiento de redes enzoóticas de mantenimiento para diversos arbovirus desde donde se pueden introducir y transmitir varios arbovirus a humanos y animales hacia el hábitat antrópico. Asimismo, uno de los sitios urbanos fue muy similar en cuanto a la abundancia y riqueza de especies con el ambiente semiurbano. Esto es de particular interés, debido a que este se encuentra inmerso

dentro de la trama urbana de la ciudad implicando mayor posibilidad de contacto entre diferentes vectores y hospedadores amplificadores y finales. El otro sitio dentro del ambiente urbano presentó la menor riqueza y diversidad de especies de Culicidae. Así el ambiente urbano se presenta muy heterogéneo con sitios con características particulares cada uno de ellos que se reflejan en las comunidades de mosquitos y que no pueden ser analizados como un todo igual. Estas diferencias también podrían expresarse en la presencia y actividad de los posibles virus de importancia sanitaria presentes y su dinámica estacional. En cuanto al análisis en las variaciones estacionales de las abundancias de los culícidos, en general estuvieron concentradas en las estaciones cálidas y con mayores precipitaciones, principalmente durante el verano. Los mosquitos del género *Culex* fueron más abundantes en primavera, siendo el subgénero *Culex* el mejor representado en cuanto a riqueza de especies y abundancia de individuos. *Culex quinquefasciatus* fue hallado casi con exclusividad en el ambiente urbano, a lo largo de todo el período de estudio. *Aedes aegypti* fue más abundante en otoño y primavera y se halló con mayor abundancia en el sitio urbano con mayor perturbación antrópica. *Culex bidens/interfor* fue hallada a lo largo de todo el período de muestreo en los tres sitios y es una especie también de interés sanitario por haberse hallada infectada en zonas templadas de Argentina con SLEV y recientes trabajos han corroborado su competencia vectorial en la transmisión del mismo virus.

Un busca de infección natural en mosquitos de importancia para la salud, se procesaron *pools* de especies de los géneros *Culex (Culex)* y *Aedes aegypti*. Fueron

detectados e identificados *Flavivirus* pertenecientes a dos grupos ecológicos, los *Flavivirus* específicos de insectos (ISF) y *Flavivirus* transmitidos por mosquitos (MBV).

Respecto a los virus ISF, 6 especies de mosquitos del género *Culex* subgénero *Culex* se detectaron infectadas naturalmente con *Culex Flavivirus* (CXFV) y los mosquitos *Ae. aegypti* con el virus *Cell Fusing Agent* (CFAV). La mayor actividad viral de los CXFV ocurrió en otoño del año 2014 en ambos ambientes. La especie *Cx. coronator* estuvo presente únicamente en el ambiente semiurbano y fue la especie que presentó la mayor actividad viral. *Culex eduardoi* y *Cx. maxi* presentaron mayor actividad viral en el ambiente semiurbano y *Cx. bidens* y *Cx. chidesteri* en el ambiente urbano. *Culex quinquefasciatus* registró actividad viral únicamente en el ambiente urbano. Poco se conoce sobre las posibles implicancias de la presencia de estos virus en la transmisión de los MBV. Asimismo, no hay estudios excepto el de nuestro grupo de trabajo sobre sus patrones espaciales o estacionales en Argentina, por lo que los resultados aquí presentados constituyen uno de los primeros aportes en ese sentido, lo que puede constituir un aporte más en su posible participación en los mecanismos de transmisión.

En relación a SLEV, un pool de la especie *Cx. eduardoi* colectado durante la primavera del primer periodo en el ambiente urbano dio positivo, con una Tasa Mínima de Infección de 0,03. Esta especie no ha sido hallada naturalmente infectada con SLEV en Argentina por lo que el presente estudio representa el primer registro de infección natural con este virus en el país. El patrón de distribución temporal y espacial de SLEV observado para otras regiones de Argentina como la templada

con múltiples introducciones del virus con sus variantes genotípicas, desde zonas periurbanas hacia zonas urbanas, podría presentarse también aquí en la región subtropical como la nuestra, ya que el pool positivo de SLEV sólo se detectó en la primavera del 2013 y luego no fue detectado en los años subsiguientes, indicando una posible dinámica de introducción-extinción en el área de estudio desde un sitio a otro.

CAPÍTULO I

Introducción General

GÉNERO *FLAVIVIRUS*

El género *Flavivirus* está compuesto por más de 50 especies virales de las cuales más de 40 son causal de enfermedades en humanos. El género también incluye un número grande y creciente de especies no clasificadas o "tentativas" (Moureau et al., 2015). Junto con los géneros *Pestivirus*, *Hepacivirus* y *Pegivirus* conforman la familia *Flaviviridae* (Genus: *Flavivirus* - *Flaviviridae* - Positive-sense RNA Viruses - International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV), n.d.)

Estructura Viral

Morfología

Las partículas de los *Flavivirus* son pequeñas, de aproximadamente 50nm de diámetro y de forma típicamente esférica. Contienen un núcleo electrodenso de 30nm, rodeado por una envoltura lipídica modificada por la inserción de 2 glicoproteínas virales integrales de membrana: la proteína E (envoltura) y la proteína M (membrana).

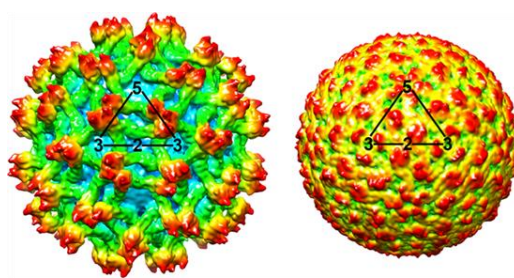


Figura 1: Reconstrucciones microscópicas tridimensionales crio electrónicas de partículas inmaduras (izquierda) y maduras (derecha) de un aislamiento del virus del dengue (cortesía de M. Rossmann). Se muestra una representación de la superficie del virus del dengue inmaduro con una resolución de 12.5 Å (izquierda) y una DENV madura con una resolución de 10 Å (derecha). Los virus se representan a escala, pero no coloreados a escala. Los triángulos delimitan una unidad icosaédrica.

Ácido nucleico

El genoma de los *Flavivirus* consiste en una cadena simple positiva de ARN, no segmentado, de aproximadamente 9,2-11 kb. El extremo 5' del genoma posee un capuchón de tipo I (m-7GpppAmp) donde el nucleótido A es seguido por un nucleótido G altamente conservado. Los extremos 3' carecen de un tramo terminal de poli (A) y terminan con el dinucleótido CU conservado.

Carbohidratos, lípidos y proteínas

La composición y estructura de los carbohidratos dependen de la célula hospedador (vertebrado o artrópodo). Los viriones contienen aproximadamente 9% de carbohidratos en peso (glicolípidos, glicoproteínas).

Los lípidos de los viriones derivan de las membranas de la célula hospedadora y conforman aproximadamente el 17% (en peso) de los viriones.

Las proteínas virales se producen como resultado de la traducción de una única poliproteína de más de 3.000 aminoácidos de longitud, que se escinde mediante una combinación de proteasas virales y del hospedador.

Las proteínas estructurales están codificadas en la porción N-terminal de la poliproteína y son tres: (i) proteína de la cápside (C), (ii) dos proteínas virales asociadas a la membrana, (prM) en viriones inmaduros y (M) en viriones maduros, y (iii) una glicoproteína de la envoltura (E). Las proteínas no estructurales (NS) son siete (NS1, NS2A-NS2B, NS3, NS4A-NS4B, NS5), y son las encargadas de regular la transcripción y replicación viral como también podrían interactuar directamente con proteínas de la célula hospedadora para modular la respuesta frente a la infección

(Lindenbach et al., 2007). Sin embargo, es poco lo que se conoce sobre las interacciones entre ellas y las proteínas de la célula hospedadora que podrían requerirse para la formación de complejos activos de replicación de ARN viral.

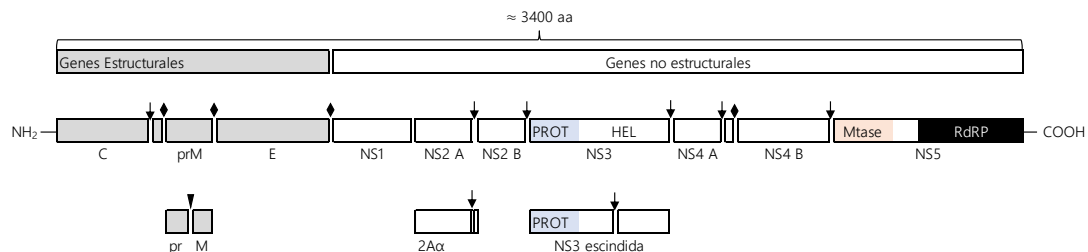


Figura 2: Expresión y estrategia de procesamiento de la poliproteína de *Flavivirus*. Los sitios de escisión de la serin-proteasa viral están indicados con flechas. El triángulo y los rombos indican los sitios de escisión con la peptidasa señal y furina o una enzima del hospedador. Además, los dominios en la NS3 de serin-proteasa (PROT) y la helicasa (HEL) y la metiltransferasa (MTase) y la ARN polimerasa dependiente de ARN (RdRP) (Lindenbach *et. al.*, 2003)

La función de cada una de las proteínas tanto estructurales como no estructurales (Fernandez-Garcia et al., 2009; Lindenbach et al., 2007) se detalla en la siguiente tabla (Tabla 1):

	Nombre	kDa	Características	Función viral
Proteínas estructurales	C	9-12	Alta proporción de aminoácidos básicos	Nucleocápside
	prM	18-20	Glicosilada	plegamiento, asociación a la membrana y ensamblaje de la proteína E
	M	8	No glicosilada	
	E	53-54	Altamente conservada	Unión a los receptores, fusión con las membranas celulares.
Proteínas no estructurales	NS1	42-50	Dos o tres sitios de N-glicosilación	Replicación, patogénesis, inmunoevasión.
	NS2 A	18-22	Bajo nivel de conservación. Carácter hidrofóbico.	Coordinar el ensamblaje, replicación del ARN.
	NS2 B	13-15	Bajo nivel de conservación	Co-factor de NS3 serin-proteasa.

	NS3	67-70	Asociada a la membrana y altamente conservada	Serin-proteasa, helicasa, replicación ARN-trifosfatasa.
	NS4 A	16,0-16,4	Bajo nivel de conservación	Replicación, ensamblaje, inducción de reordenamientos de membrana.
	NS4B	27-28	Bajo nivel de conservación	Ensamblaje.
	NS5	104-106	Altamente conservada.	Metiltransferasa, ARN-polimerasa dependiente de ARN (RdRp)

Replicación viral y traducción del genoma

Los *Flavivirus* se internalizan por endocitosis mediada por receptor (Figura 3, 1) y se transportan en vesículas lisosomales, donde el ambiente ácido induce la fusión (Figura 3, 2) entre el virus y la membrana vesicular, lo que produce la liberación de la nucleocápside viral al citoplasma, una vez allí el genoma viral es leído como un único ARN mensajero (Figura 3, 3). La traducción del ARN viral es seguida por el procesamiento de la poliproteína resultante, las proteínas codificadas por el virus y por la célula hospedadora (Figura 3, 4). Los sitios de escisión y la topología de las proteínas estructurales (en verde) y no estructurales (NS) (en rojo) en la membrana del retículo endoplásmico (RE) se ilustran esquemáticamente (Figura 3, 4). Después de la traducción, se ensambla el complejo de replicación y se asocia a membranas inducidas por virus donde tiene lugar la replicación viral (Figura 3, 5). El complejo de replicación comienza a transcribir la plantilla de ARN (+) en ARN (-), que luego sirve como plantilla para la nueva síntesis de ARN (+). Las cadenas de ARN de

progenie (+) pueden iniciar un nuevo ciclo de traducción o ensamblarse en viriones (Figura 3, 6). El empaquetamiento se produce en la superficie del RE, seguido de la gemación de las proteínas estructurales y del ARN recién sintetizado en el lumen del RE. Los viriones inmaduros resultantes se transportan a la región trans-Golgi donde la división de prM a M mediada por furina genera partículas infecciosas maduras (Figura 3, 7) que se liberan por exocitosis (Figura 3, 8) (Fernandez-Garcia et al., 2009).

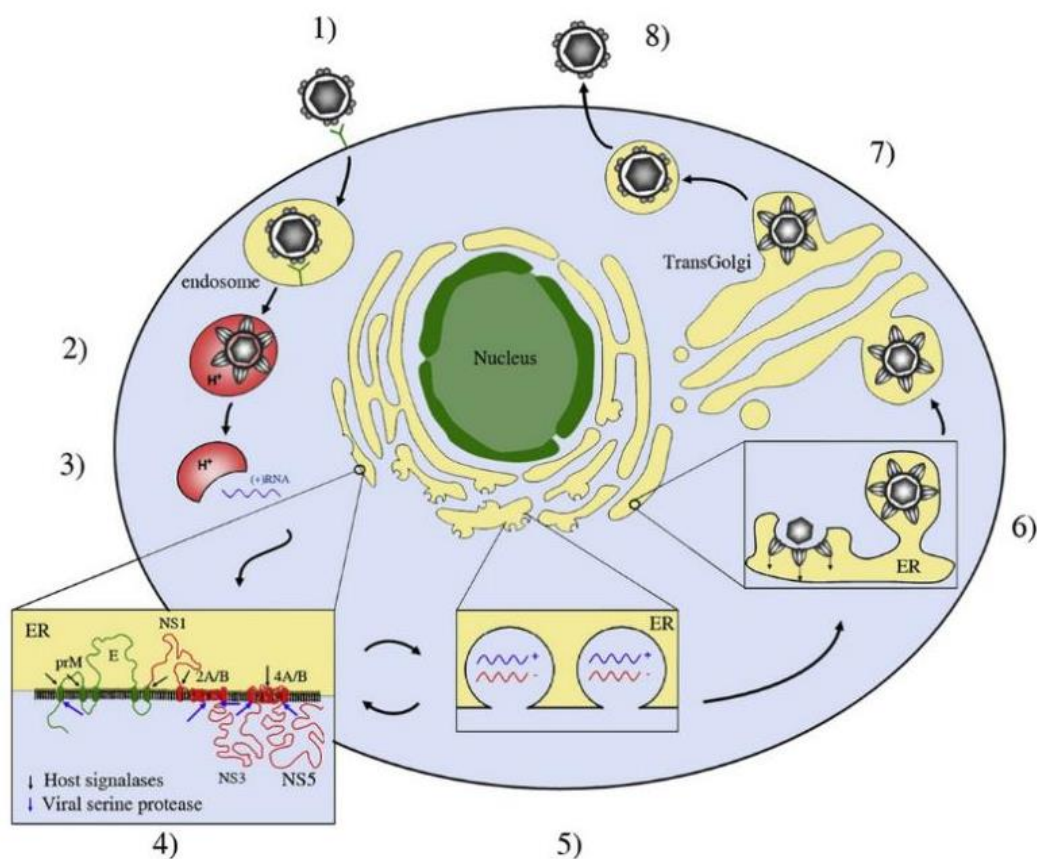


Figura 3: Infección y replicación de los *Flavivirus* en la célula hospedadora (Fernandez-Garcia et. al., 2009)

TAXONOMÍA DEL GÉNERO

Los *Flavivirus* se caracterizan por ser un grupo muy diverso con redes de mantenimiento y transmisión variadas, complejas y poco conocidas. Presentan una distribución global y una alta carga de morbilidad humana (Coffey et al., 2013; Gubler, 2002). Esta notable diversidad está asociada al genoma de ARN, lo que le otorga una amplia variabilidad genética, adaptación a mecanismos complejos de patogénesis y amplitud en las asociaciones con vectores y hospedadores. Esto ha tenido una profunda y duradera influencia en el desarrollo de la investigación virológica y, más específicamente, en la taxonomía y la filogeografía que se actualiza constantemente para reflejar los virus recién identificados y los avances en los métodos analíticos debido a la implicancia que tienen en la salud y en la economía (Moureau et al., 2015).

El género *Flavivirus*, es posible dividirlo en grupos ecológicos: (i) *Flavivirus* transmitidos por mosquitos o MBF (del inglés "Mosquito Borne *Flavivirus*") que infectan una variedad de hospedadores vertebrados a través de picaduras de mosquitos (ii) *Flavivirus* transmitidos por garrapatas o TBF (del inglés "Tick Borne *Flavivirus*"), estos dos grupos son arbovirus (del inglés ARtropod BORne VIRUS); (iii) virus con vector desconocido o NKVF (del inglés "No Know Vector *Flavivirus*") son virus zoonóticos transmitidos entre roedores o murciélagos sin artrópodo vector conocido; y (iv) virus específicos de insectos o ISF (del inglés "Insect Specific *Flavivirus*") son los *Flavivirus* de insectos, capaces de replicar únicamente en células de artrópodos (Lobo et al., 2009; Simmonds et al., 2017).

FLAVIVIRUS TRANSMITIDOS POR MOSQUITOS (MBF).

Estos *Flavivirus* se caracterizan por tener un ciclo biológico que involucra dos hospedadores muy diferentes, el vector invertebrado (mosquito en este caso) y algún hospedador vertebrado, estos pueden ser aves, roedores, humanos y primates no-humanos. Juntos, estos dos hospedadores constituyen el reservorio del virus (Kramer, 2016). Las interacciones entre virus, vector y hospedador son complejas y dinámicas y se ven afectadas por una diversidad de factores asociados a la cepa viral, genética vectorial, susceptibilidad del hospedador, temperatura, precipitación, uso del suelo humano (Ciota et al., 2010; Forrester et al., 2014; Forrester et al., 2014).

La transmisión de los *Flavivirus* a hospedadores vertebrados ocurre principalmente por la picadura de mosquitos infectados a través de la saliva (Kenney et al., 2014). Otros virus que pertenecen a las familias *Togaviridae*, *Bunyaviridae*, *Reoviridae* y *Rhabdoviridae* también son transmitidos por mosquitos y otros artrópodos infectados, como culicoides, garrapatas y flebótomos. Juntos conforman el grupo ecológico de los arbovirus (Arthropod- Borne-Virus) (Gubler, 2002; Kenney et al., 2014).

Infección por *Flavivirus* en mosquitos

Transmisión biológica

La infección de los mosquitos con *Flavivirus* ocurre por vía oral mientras se alimenta de la sangre del vertebrado virémico, sólo los hospedadores vertebrados

que manifiestan una carga viral superior al umbral mínimo de infección pueden contribuir al ciclo de transmisión (Weaver, 1997), el vector transmite el virus a un hospedador susceptible por la misma vía (inoculando saliva infectada). Este mecanismo de transmisión es denominada transmisión vectorial, y se caracteriza por la replicación del virus en las células de los tejidos del mosquito antes de la transmisión.

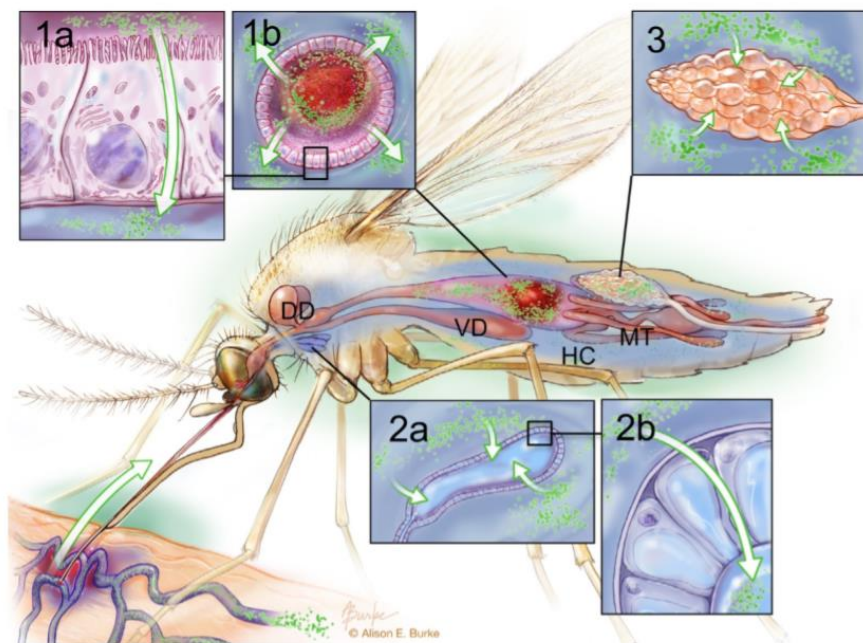


Figura 4: Diagrama de la anatomía del mosquito indicando las diferentes barreras de infección, diseminación y transmisión. Panel 1: epitelio del intestino medio (a) virus se mueve del lado apical al lado basolateral de la célula epitelial; (b) sección sagital del intestino medio. Panel 2: infección de las glándulas salivares (a) vista lateral que demuestra la exposición de partículas virales a las glándulas salivales del lado basal (b) plano sagital que demuestra el paso del virus desde la región basal a la apical de las células de la glándula salival hacia el conducto de la glándula salival. Panel 3: infección viral de tejido ovárico para la transmisión vertical potencial. Abreviaturas: DD divertículo dorsal; HC hemocele; MT túbulos de Malpighi; VD divertículo ventral (Kenney *et. al.*, 2014).

Para que la transmisión biológica ocurra, el virus debe poder superar el paso de una serie de barreras físicas y fisiológicas en el mosquito (competencia vectorial). Durante la alimentación con sangre infectada, el virus en el intestino medio del mosquito, debe infectar el epitelio intestinal y replicarse (Figura 4, 1A). Luego debe superar la barrera física de la lámina basal (Figura 4, 1B) y dirigirse por medio de la hemolinfa a las glándulas salivales (Figura 4, 2A), donde se replica y acumula, transmitiéndose hacia otros hospedadores mediante la inoculación de saliva infectada con la próxima alimentación sanguínea de la hembra infectada (Figura 4, 2B) (Kenney et al., 2014).

Múltiples factores pueden influir fuertemente sobre la competencia vectorial. Estos factores son propios del mosquito o "factores intrínsecos del vector" e incluyen la composición genética de la población del mosquito (Reisen et al., 2008), la microbiota intestinal característica, entre otros. Sin embargo, el rol como vector de una especie particular de mosquito en la transmisión de un patógeno en un contexto ecoepidemiológico concreto está influenciado por otros factores como el patrón alimenticio del artrópodo, longevidad de las hembras, abundancia poblacional y la competencia vectorial. Por lo tanto, "el efecto combinado de todos los factores fisiológicos, ecológicos y ambientales relacionados con el vector, el hospedador y el virus, que determinarán la capacidad de una especie de mosquito dada para actuar como un vector competente para un virus en particular" se define como capacidad vectorial (Garrett-Jones 1964; Hardy et al., 1983).

Otras vías de transmisión biológica

Si bien los *Flavivirus* transmitidos por mosquitos se mantienen en la naturaleza principalmente por transmisión vectorial horizontal (TH) desde un vector infectado a un hospedador susceptible, se ha propuesto la transmisión vertical (TV) como mecanismo de mantenimiento en condiciones adversas para la TH (Lequime et al., 2016). La TV puede ocurrir desde una hembra infectada a su descendencia por la infección de las células del tejido ovárico (Figura 4, 3) o por contaminación de los huevos durante la oviposición, llamada transmisión transovárica (TTO) (Higgs et al., 2004; Rosen, 1988). Se han detectado los virus *Zika* (ZIKV; *Flaviviridae: Flavivirus*) y *Dengue* (DENV; *Flaviviridae: Flavivirus*) en huevos de *Aedes aegypti* (Linnaeus) colectados en campo en el estado de Amazonas, Brasil, siendo el primer registro de TV natural y TTO de los virus en mosquitos *Ae. aegypti* (da Costa et al., 2018, 2017).

Otra vía alternativa de TV es entre mosquitos machos y hembras durante la reproducción denominada transmisión venérea (TVN). Por ejemplo, se ha demostrado TVN en machos *Ae. albopictus* (Skuse) infectados mediante la inoculación intratorácica con DENV-1 antes del apareamiento (Rosen, 1987). Para comprobar la TVN de ZIKV en mosquitos *Ae. aegypti*, Pereira-Silva et al., (2017) realizaron, en condiciones de laboratorio, inoculaciones intratorácica en machos y alimentación de las hembras con una suspensión de ZIKV por vía oral, dando como resultado que tanto machos como hembras pudieron transmitir el virus durante el apareamiento demostrando que la infección por ZIKV se produce no solo durante la alimentación sanguínea sino también por TVN. Sánchez-Vargas et al., (2018)

demonstraron en una cepa de *Ae. aegypti* genéticamente diversa (del inglés- Genetically Diverse Laboratory Strain [GDLS]) que el virus DENV-2 se transmite de manera eficiente de una generación a la siguiente (TTO). Además, la progenie masculina infectada que surge de la transmisión vertical puede infectar a las hembras durante el apareamiento (TVN).

Los *Flavivirus* no son los únicos virus transmitidos por mosquitos en el que se ha documentado la TV y TVN, en los géneros *Bunyavirus* (Thompson et al., 1977), *Alphavirus* (Mavale et al., 2010; Ovenden et al., 1984) y *Rabdovirus* (Mavale et al., 2005) también han demostrado TV.

Estos son algunos de los trabajos que podrían sugerir a los mecanismos de TV como alternativos para que los *Flavivirus* (y otros arbovirus) puedan mantenerse en una población de vectores independiente de la alimentación con hospedadores virémicos.

Transmisión no Biológica

Transmisión directa

Todos los grupos de virus comparten la transmisión directa y se considera el mecanismo fundamental en todos los grupos de virus animales. Por lo tanto, no es sorprendente que este modo de transmisión esté extendido entre todos los principales grupos de arbovirus, sin ser la principal vía de transmisión entre los arbovirus (Kuno, 2001). Por ejemplo, el virus *Venezuelan equine encephalitis* (VEEV; *Togaviridae: Alphavirus*) es fácilmente transmisible por aerosol (Kuno et al., 2005).

En circunstancias especiales, el DENV también pueden infectar a los vertebrados con aerosol si las concentraciones de los virus son suficientemente altas (Kuno, 2005). Los virus *Rift Valley fever* (RVFV, *Bunyaviridae: Phlebovirus*), *Yellow fever* (YFV; *Flaviviridae: Flavivirus*) y *Japanese encephalitis* (JEV; *Flaviviridae: Flavivirus*) pueden infectar animales insectívoros, como murciélagos, cuando estos se alimentan de mosquitos infectados (Kuno, 2001).

La transmisión directa en etapas inmaduras de los mosquitos es poco conocida, sin embargo, se ha documentado que algunos virus como YFV, JEV, RVFV y el virus *Western equine encephalitis* (WEEV; *Togaviridae: Alphavirus*) podrían transmitirse por vía oral a las larvas de mosquito cuando estas se alimentan en agua contaminada (Chamberlain et al., 1961; Kuno et al., 2005)

Transmisión Mecánica

Ocurre por contacto directo del aparato bucal contaminado del artrópodo vector con el hospedador vertebrado (Kuno et al., 2005). Este tipo de transmisión al igual que la transmisión directa, no requiere de la amplificación del virus dentro del vector. Muchos insectos dípteros están implicados en la transmisión mecánica; y su eficiencia aumenta cuando la densidad de virus infectados aumenta en el medio ambiente (Kuno et al., 2005). La transmisión mecánica incluye (entre otros virus) a RVFV y el virus *Bovine viral diarrhea* (BVDV; *Flaviviridae: Pestivirus*). Además, durante los brotes de RVFV en África y VEEV en Colombia, se especuló que la transmisión mecánica podría haber contribuido en el número de casos (Kuno et al., 2005).

TAXONOMÍA Y BIONOMÍA DE MOSQUITOS VECTORES DE *FLAVIVIRUS* EN ARGENTINA

A partir del siglo XIX, y gracias a los aportes de Finlay (1881) y Beaupérthuy (apud Gillett, 1971) sobre fiebre amarilla causada por el YFV, se elaboraron las primeras hipótesis sobre el papel epidemiológico de los culícidos como vectores biológicos de patógenos (Forattini 2002). Los mosquitos forman actualmente la familia Culicidae, la cual puede ser dividida en dos subfamilias: Anophelinae y Culicinae. Esta última con un mayor número de representantes, incluye 11 tribus (Forattini, 2002). Las tribus desarrolladas a continuación, Aedini y Culicini, son las que presentan el mayor número de representantes de interés epidemiológico.

Mosquitos de la tribu Aedini.

Comprende nueve géneros, de los cuales tres poseen representantes neotropicales, *Aedes*, *Psorophora* y *Haemagogus*. Los hábitos en general de los adultos de gran parte de la tribu tienen actividad diurnas o crepuscular vespertina. Son mosquitos de gran insistencia y sus huevos presentan mecanismos que les permiten sobrevivir o resistir a la desecación (Forattini, 2002).

Los mosquitos del género *Aedes* presentan diapausa o quiescencia posterior al término del desarrollo embrionario que antecede a la eclosión. La diapausa involucra la larga detención estable de la eclosión de los huevos inducida por distintos factores, pero con un fuerte componente genético (Forattini, 2002). En contraste, la quiescencia no estacional es inducida por condiciones ambientales no favorables y cesa rápidamente después de la exposición a condiciones adecuada para la eclosión, como la inundación (Mullen et al., 2009). Las hembras del género

Aedes no oviponen en medio líquido, sino que lo hacen por encima de la superficie del agua, en recipientes o sustratos con capacidad potencial de transformarse en criaderos. Comprende más de 900 especies actualmente distribuidas en 44 subgéneros. Estos Culícidos tienen una distribución mundial, y en la región neotropical en la que se citan 9 subgéneros: *Ochlerotatus*, *Howardina*, *Protomacleaya*, *Stegomyia*, *Aedimorphus*, *Gymnometopa*, *Kompia*, *Abraedes* y *Aztecaedes*. La mayoría de las especies americanas está incluida en los primeros tres Subgéneros nombrados y en Argentina están citadas *Howardina*, *Ochlerotatus* y *Stegomyia*. Los mosquitos que hasta el momento son de importancia epidemiológica están incluidos en los dos últimos subgéneros *Ochlerotatus* y *Stegomyia*.

Subgénero *Stegomyia*

Aedes aegypti y *Ae. albopictus* son las únicas especies del subgénero citadas para Argentina (Rossi, 2015). *Aedes aegypti* originaria del continente africano, se introdujo en el continente americano a través del comercio de esclavos durante los siglos XVI al XIX (Bryant et al., 2007). En Argentina, *Ae. aegypti* estuvo presente durante la primera mitad del siglo pasado en las provincias del Norte y Centro (Bejarano, 1979). La campaña de erradicación hemisférica comenzó en 1947 con el objetivo de eliminar *Ae. aegypti* del continente (Organización Panamericana de la Salud, 1947). En Argentina, se consideró erradicado en 1963 por el Ministerio de Salud Pública Nacional (NPHM) (Carcavallo et al., 1968), y en 1965 por el Consejo Directivo de la Organización Panamericana de la Salud (Bejarano, 1979). La

reinfestación de *Ae. aegypti* se detectó en 1986 en Misiones y Formosa (Curto et al., 2002). Unos años más tarde, se registró mil kilómetros al sur en Buenos Aires (Campos, 1993). Actualmente, el hallazgo más occidental corresponde a la provincia de Mendoza en el año 2000 (Departamento de Guaymallén) (Dominguez et al., 2001) y el registro más austral se encuentra en la provincia de La Pampa (Santa Rosa) (Rossi et al., 2006). Esto implica que la distribución se ha expandido hacia el oeste y el sur en comparación con la distribución histórica. (Vezzani et al., 2008; Zanotti et al., 2015). Por otro lado, *Ae. albopictus* es una especie originaria del continente asiático y poblaciones bien establecidas de esta especie fueron descubiertas por primera vez en el continente americano en agosto de 1985, criando en depósitos de neumáticos al aire libre en los alrededores de Houston, Texas (Pena et al., 2003). La dispersión de *Ae. albopictus* en el continente americano ha sido relativamente rápida, ya que diez años más tarde se lo había detectado en 22 estados de los Estados Unidos de América (EE.UU.). En Argentina, contrariamente a lo que se pensaba respecto a que *Ae. albopictus* podría dispersarse más hacia el sur por la tolerancia al frío de las poblaciones bien establecidas en América del Norte, a 18 años de su detección (Rossi et al., 1999) sólo se lo ha citado en 5 localidades de la provincia de Misiones (Vezzani et al., 2008).

- MBV transmitidos por mosquitos del género *Aedes* (*Stegomyia*)

Virus *Yellow Fever*

El YFV es endémico de las zonas selváticas de África y América Central y del Sur. Presenta dos ciclos de transmisión: urbano y selvático. En la transmisión urbana

intervienen mosquitos *Ae. aegypti* y el hombre. En Argentina, la primera epidemia urbana registrada fue en el año 1871, en la provincia de Buenos Aires con más de 10.000 casos. Afortunadamente, en Sudamérica sólo se registra la transmisión selvática. Este tipo de transmisión involucra a primates no humanos (*Alouatta* spp.) y mosquitos de los géneros *Haemagogus* spp. y *Sabethes* spp. El primer brote de YFV selvático ocurrió en el año 1966 en las provincias de Misiones y Corrientes. En el 2007 se produce la reemergencia del virus YFV selvático en nuestro país, con casos en humanos y en primates, reportándose el primer caso humano en un trabajador rural de la localidad de El Peñalito en la provincia de Misiones. Desde entonces, y a lo largo del año 2008 hasta enero del año 2009, fueron confirmadas 12 epizootias (11 en Misiones y 1 en Corrientes) (Contigiani et al., 2016; Holzmann et al., 2010).

Virus *Dengue*

El dengue es una enfermedad endemoepidémica causada por cinco serotipos de DENV. En Argentina, el ciclo de transmisión es únicamente urbano, entre mosquitos *Ae. aegypti* y humanos. La primera epidemia reportada tuvo lugar en el año 1916 en las provincias de Corrientes y Entre Ríos, el virus se introdujo desde Paraguay y durante la epidemia afectó al 50% de la población de la región mesopotámica en ese momento (Gaudino 1916). Con la reinfestación del vector *Ae. aegypti* en 1987, ocurrieron los primeros casos autóctonos de dengue en el año 1997, alcanzando en la actualidad, una distribución similar o mayor a la que se tenía con anterioridad a las campañas de erradicación de la década del 60'. Es así que,

entre enero de 2008 y mayo de 2009, nuestro país se vio afectado por una muy importante epidemia de dengue con más de 26000 casos, más de la mitad de las provincias afectadas y el 50% de los casos aportados por la provincia de Chaco (Ministerio de Salud de la Nación, 2009). Durante el 2010 se reportaron un total de 800 casos en la provincia de Misiones y casos autóctonos en las provincias de Chaco, Jujuy, Salta, Santa Fe, Santiago del Estero y Buenos Aires (Ministerio de Salud de la Nación, 2010). Desde entonces y hasta la actualidad, se detectan casos autóctonos en Argentina. Sin embargo, el DENV no es endémico en Argentina, es decir que se requiere su introducción desde países con circulación endémica (Contigiani et al., 2016). En el verano de 2015-2016 y hasta el otoño de 2016 Argentina sufrió la peor epidemia de dengue de su historia, registrándose más de 60.000 casos confirmados, con el peor escenario en la provincia de Misiones que reportó más del 80% de los casos. En esta última epidemia se produjeron 11 defunciones (Ministerio de Salud de la Nación, 2016).

Mosquitos de la tribu Culicini

La tribu Culicini agrupa 795 especies (Mosquito Taxonomic Inventory, 2018) en 4 géneros: *Culex* (768 especies), *Deinocerites* (18 especies), *Galindomyia* (1 especie) y *Lutzia* Theobald 1903 (8 especies). El género *Culex* incluye 769 especies agrupadas en 26 subgéneros, excepto 7 que no poseen ubicación subgenérica (Mosquito Taxonomic Inventory, 2018). El subgénero *Culex* incluye 198 especies (Mosquito Taxonomic Inventory, 2018) y, como todo grupo numeroso, las hembras de estas especies presentan caracteres polimórficos, que son muy similares entre sí.

El subgénero incluye complejos de especies, definidos como grupos de especies que satisfacen el concepto biológico (Dobzhansky, 1937; Mayr, 1942) pero no son distinguibles por caracteres morfológicos o sólo por un número muy reducido, de allí la dificultad en su determinación específica en el estado adulto. En general, las larvas del género *Culex* crían en cuerpos de agua permanentes o semipermanentes, pero una gran variedad de especies vive exclusivamente en axilas de hojas, agujeros de árboles, agujeros de roca y cuevas de cangrejos (Cardo, 2016). Además de estos criaderos naturales, algunas especies de *Culex* son generalistas y las formas inmaduras pueden encontrarse criando tanto en hábitats artificiales como naturales. El agua de los hábitats se caracteriza por ser rica en materia orgánica y en estado de fermentación (Forattini, 2002).

Subgénero *Culex*

El subgénero *Culex* presenta distribución cosmopolita, y tiene especies en todas las regiones zoogeográficas siendo la mayoría de ellas de importancia médica. Las hembras son principalmente activas durante los períodos crepusculares o nocturnos. En Argentina, el subgénero *Culex* está representado por 29 especies (Rossi, 2015), entre ellas *Cx. pipiens quinquefasciatus* Say, con la más amplia distribución en el país, entre las especies del subgénero (Rossi, 2015). La importancia sanitaria del subgénero en el país incluye la transmisión de patógenos como filarias del género *Wuchereria* y los virus *Saint Louis encefalitis* (SLEV; *Flaviviridae: Flavivirus*) y *West Nile* (WNV; *Flaviviridae: Flavivirus*).

- MBV transmitidos por mosquitos del género *Culex*(*Culex*)

Virus *West Nile*

El WNV tiene un amplio rango de hospedadores y vectores, la red o trama de transmisión (Diaz et al., 2013) es mantenido por mosquitos vectores del género *Culex* spp. y aves Passeriformes. Si bien el hombre y los equinos pueden infectarse de manera accidental, no contribuyen a la red de transmisión. En América, el comportamiento eco-epidemiológico es muy poco conocido a excepción de los Estados Unidos. En Argentina se registra su presencia en el año 2006 en tres equinos muertos por encefalitis por WNV en un establecimiento rural de las provincias de Buenos Aires y Entre Ríos (Morales et al., 2006). Sin embargo, estudios de seroprevalencia en aves silvestres del centro y norte de Argentina, demostraron la existencia de actividad autóctona desde el año 2004 (Diaz et al., 2008). En el 2010 se detectó un pequeño brote en equinos de la localidad de Vicuña Mackenna en la provincia de Córdoba, y otros estudios de seroprevalencia han demostrado infección en equinos de las provincias de Buenos Aires, Chaco, Córdoba, Entre Ríos, Formosa, Santa Fe y Santiago del Estero (Contigiani et al., 2016; Oria et al., 2018).

Virus St. Louis encephalitis

El SLEV es mantenido en la naturaleza por mosquitos del género *Culex* y hospedadores aviares (Contigiani et al., 2016). En Argentina es endémico y presenta una amplia distribución geográfica en las zonas templadas y subtropicales de Argentina (Sabattini et al., 1998). En el 2005 se produce la primera epidemia en

Sudamérica, ocurrida en la provincia de Córdoba, con 9 casos fatales (Spinsanti et al., 2008). Los estudios realizados por Díaz et al., (2011, 2012) y (Rivarola et al., 2014) permitieron concluir que la introducción de una nueva cepa con mayor virulencia amplificó de manera extraordinaria gracias al incremento de las poblaciones de vectores *Cx. quinquefasciatus* y *Cx. interfor*, y a la disponibilidad de hospedadores amplificadores como la paloma *Zenaida auriculata* (Díaz et al., 2018).

FLAVIVIRUS ESPECÍFICOS DE INSECTOS (ISF)

Además de los virus patógenos tales como DENV, YF, SLEV entre otros, los mosquitos también se infectan con una amplia variedad de *Flavivirus* específicos de insectos. Este último grupo está compuesto por un número creciente de virus que pertenecen a diferentes taxones de las familias clásicas de los arbovirus. Si bien la mayoría se han colocado dentro de la familia *Flaviviridae* en base a análisis filogenéticos, algunos virus específicos de insectos han sido clasificados en otras familias como *Togaviridae*, *Rhabdoviridae*, *Bunyaviridae*, *Reoviridae*, *Mesoniviridae*, *Tymoviridae*, *Birnaviridae*, como en otros taxones nuevos (Bolling et al., 2015).

El primer *Flavivirus* específico de insectos, llamado *Cell Fusing Agent* (CFAV; *Flaviviridae: Flavivirus*) fue aislado en el año 1975 de una línea celular de *Ae. aegypti* que produjo sincicios masivos en las células de *Ae. albopictus* inoculadas con el líquido del cultivo, sin embargo, no pudo replicar en las tres líneas celulares de vertebrados (BHK-21, KB y Vero) probadas. Aproximadamente 17 años después se obtuvo la secuencia completa del genoma de CFAV, en el cual la organización del

genoma es similar a la de otros *Flavivirus* y aunque la identidad de secuencia es baja entre las proteínas estructurales de CFAV y otros *Flavivirus*, hay una considerable identidad de secuencia en las proteínas no estructurales NS3 y NS5 (Cook et al., 2006). Estudios filogenéticos del género *Flavivirus* sugieren que CFAV podría representar un linaje basal del género y que esta divergencia ocurrió antes de la separación de los *Flavivirus* transmitidos por mosquito y garrapatas (Cammisa-Parks et al., 1992; Kuno et al., 1998; Marin et al., 1995).

Pasaron más de 25 años hasta el descubrimiento del segundo *Flavivirus* específico de insecto llamado virus *Kamiti River* (KRV) el cual fue obtenido de larvas y pupas de mosquitos *Ae. macintoshi* recogidos de humedales superficiales en Kenia, el cual se encontró que estaba relacionado con CFAV (Crabtree et al., 2003; Sang et al., 2003). El KRV también causó efectos citopáticos (ECP) en las células de *Ae. albopictus* (C6/36), pero no la fusión celular, una característica distintiva del CFAV (Crabtree et al., 2003). Similar a CFAV, KRV no pudo replicar en células de vertebrados. Mientras que el CFAV se aisló de las células de insectos en el laboratorio, el aislamiento de KRV demostró por primera vez la presencia de *Flavivirus* específicos de insectos en la naturaleza, un año después, se encontraron secuencias estrechamente relacionadas con CFAV y KRV integradas en los genomas de mosquitos *Aedes* spp. criados en laboratorio y capturados en el campo (Crochu et al., 2004).

En 2007, se identifica el primer *Flavivirus* específico de insectos asociado a mosquitos del género *Culex*, (anteriormente los *Flavivirus* específicos de insectos

solo estaban asociados principalmente con mosquitos del género *Aedes*). Este *Flavivirus* específico de insectos llamado *Culex Flavivirus* (CXFV; *Flaviviridae: Flavivirus*) fue encontrado en mosquitos *Cx. pipiens* Linnaeus, *Cx. quinquefasciatus* y *Cx. tritaeniorhynchus* Giles colectados en Japón e Indonesia (Hoshino et al., 2007). El análisis filogenético de las secuencias de aminoácidos de la proteína E de CXFV y otros *Flavivirus* reveló que CXFV se agrupa con CFAV y KRV en el clado de los *Flavivirus* específicos de insectos. De forma similar a los virus específicos de insectos previamente descritos, CXFV no infectó células de vertebrados, pero no causó ECP severo en células C6/36, como lo observado con CFAV y KRV (Hoshino et al., 2007). Desde entonces, CXFV se ha aislado de numerosos mosquitos del género *Culex* recolectados en muchas partes del mundo y parece ser de naturaleza ubicua (Bolling et al., 2015).

Antecedentes en América y Argentina de ISF.

Como parte de un estudio para investigar la distribución y biodiversidad de los *Flavivirus* y sus vectores, (Cook et al., 2018) colectaron mosquitos en ambientes silvestres en Puerto Rico y en una isla cercana, Culebra, en el año 2002. Los resultados determinaron la presencia de una nueva cepa de CFAV en especies de mosquitos distintas a *Ae. aegypti*, incluyendo *Ae. albopictus* y *Culex* spp. Siendo el primer aislamiento de la cepa CFAV Culebra y el primer descubrimiento de este virus en una población de mosquitos naturales en América y en el género *Culex*. Además, esta nueva cepa de CFAV fue detectada en mosquitos de ambos sexos, y debido a la amplia distribución (cinco localidades de Puerto Rico), sugirieron que

este virus podría ser transmitido en la naturaleza de manera vertical. Dos años después, se detecta CxFV en mosquitos *Cx. quinquefasciatus* colectados en Puerto Barrios, Departamento de Izabal, en Guatemala, la nueva cepa de CxFV es llamada Izabal 2006 (Morales-Betoulle et al., 2008). En México, CxFV fue detectado por RT-PCR en 145 pools de 210 pools testeados de mosquitos *Cx. quinquefasciatus* colectados en 2007. Al igual que las cepas de CxFV anteriormente nombradas, no causó ECP en las células C6/36 (Farfan-Ale et al., 2009). Para determinar la presencia de CxFV en otras especies de *Culex* spp., (Saiyasombat et al., 2010) testearon 121 pools (1.856 mosquitos adultos) *Culex* spp. pertenecientes a cinco especies, solo dos pools de mosquitos hembra de *Cx. interrogator* Dyar&Knab resultaron positivos para CxFV. En mosquitos *Cx. quinquefasciatus* y *Cx. restuans* Theobald colectados en Texas durante el mes de febrero y marzo de 2008 y *Cx. quinquefasciatus* colectados en Trinidad en el mes de febrero del mismo año, fueron positivos para CxFV (Kim et al., 2009). A pesar de la similitud genética, los Flavivirus de mosquitos de Texas analizados mostraron diferencias fenotípicas (Kim et. al., 2009). La cepa TX 24518 produjo marcado ECP con formación de sincitios en células C6/36, ECP similar al ya descrito para CFAV, mientras que los otros seis aislados de mosquitos de Houston no lo hicieron (Kim et. al., 2009). Hoshino et al. (2007) informaron que algunos, pero no todas las cepas japonesas de CxFV aisladas también produjeron ECP y agregación celular. El análisis filogenético del gen de la proteína E agrupó a los CxFV de Texas con los CxFV aislados en Asia (Japón e Indonesia) y los CxFV

aislados de mosquitos de Trinidad mostraron ser más similares a los CxFV de Centro América (Kim et. al., 2009).

El primer registro de CxFV en Sudamérica fue en mosquitos *Culex* spp. colectados en áreas urbanas de São José do Rio Preto (SJRP), Brasil en abril de 2007 hasta enero de 2008. El 49,4% de los pools testeados fueron positivos para CxFV. El análisis filogenético de la región NS5 realizado por Machado et al. (2012) agrupó las muestras CxFV de SJRP (Brasil) con cepas de CxFV de América Latina y el Caribe, por lo que sugieren la posible existencia de cepas América Latina/Caribe y cepas Asia/América. En Argentina, el primer registro de *Flavivirus* específicos de insectos fue de CxFV en mosquitos capturados en un área rural de la provincia de Corrientes. Un total de 123 pools fueron testeados, 16 pools fueron positivos para CxFV con una prevalencia de 100% en *Cx. maxi*, *Cx. usquatus* (Dyar) y *Cx. nigripalpus* Theobald 83,3% en *Cx. quinquefasciatus*, y 61,5% en *Culex* spp. (Goenaga et al., 2014).

-
- Bejarano JF. Estudio sobre fiebre amarilla selvática en la República Argentina. Necesidad de una organización de lucha antiamarillica. Buenos Aires: 1979.
- Bolling BG, Weaver SC, Tesh RB, Vasilakis N. Insect-Specific Virus Discovery: Significance for the Arbovirus Community. *Viruses* 2015;7:4911–28. doi:10.3390/v7092851.
- Bryant JE, Holmes EC, Barrett ADT. Out of Africa: A Molecular Perspective on the Introduction of Yellow Fever Virus into the Americas. *PLoS Pathog* 2007;3:e75. doi:10.1371/journal.ppat.0030075.
- Cammisa-Parks H, Cisar LA, Kane A, Stollar V. The complete nucleotide sequence of cell fusing agent (CFA): homology between the nonstructural proteins encoded by CFA and the nonstructural proteins encoded by arthropod-borne flaviviruses. *Virology* 1992;189:511–24.
- Campos RE. Presencia de *Aedes (Stegomyia) aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) en la localidad de Quilmes (Buenos Aires, Argentina). *Rev La Soc Entomológica Argentina* 1993;52:36.
- Carcavallo RU, Martinez A. Entomoepidemiología de la República Argentina. fiebre Amarilla, vectores y cadena epidemiológica. *Comun Cient ITA Investig Científicas y Técnicas Las Fuerzas Armadas* 1968:105–44.
- Cardo MV. Mosquitos que crían en cuerpos de agua permanentes (Subfamilia Culicinae). In: Berón CM, Campos RE, Gleiser RM, Díaz-Nieto LM, Salomon OD, Schweigmann N, editors. *Investig. sobre mosquitos Argentina*. Primera, Mar Del Plata: Universidad Nacional de Mar del Plata; 2016, p. 94–104.
- Chamberlain RW, Sudia WD. Mechanism of Transmission of Viruses by Mosquitoes. *Annu Rev Entomol* 1961;6:371–90. doi:10.1146/annurev.en.06.010161.002103.
- Ciota AT, Kramer LD. Insights into arbovirus evolution and adaptation from experimental studies. *Viruses* 2010;2:2594–617. doi:10.3390/v2122594.
- Coffey LL, Forrester N, Tsetsarkin K, Vasilakis N, Weaver SC. Factors shaping the adaptive landscape for arboviruses: implications for the emergence of disease. *Future Microbiol* 2013;8:155–76. doi:10.2217/fmb.12.139.
- Contigiani MS, Díaz LA, Spinsanti LI, Tauro LB. Arbovirus. In: Berón CM, Campos RE, Gleiser RM, Díaz-Nieto LM, Salomon OD, Schweigmann N, editors. *Investig. sobre mosquitos Argentina*. Primera, Mar Del Plata: Universidad Nacional de Mar del Plata; 2016, p. 157–78.
- Cook S, Bennett SN, Holmes EC, De Chesse R, Moureau G, de Lamballerie X. Isolation of a new strain of the flavivirus cell fusing agent virus in a natural mosquito population from Puerto Rico. *J Gen Virol* 2006;87:735–48. doi:10.1099/vir.0.81475-0.
- Cook S, Bennett SN, Holmes EC, Chesse R De, Moureau G, Lamballerie X De. Isolation of a new strain of the flavivirus cell fusing agent virus in a natural mosquito population from Puerto Rico 2018:735–48. doi:10.1099/vir.0.81475-0.
- da Costa CF, dos Passos RA, Lima JBP, Roque RA, de Souza Sampaio V, Campolina TB, et al. Transovarial transmission of DENV in *Aedes aegypti* in the Amazon basin: a local model of xenomonitoring. *Parasit Vectors* 2017;10:249. doi:10.1186/s13071-017-2194-5.
- da Costa CF, Silva AV da, Nascimento VA do, Souza VC de, Monteiro DC da S, Terrazas WCM, et al. Evidence of
-

- vertical transmission of Zika virus in field-collected eggs of *Aedes aegypti* in the Brazilian Amazon. *PLoS Negl Trop Dis* 2018;12:e0006594. doi:10.1371/journal.pntd.0006594.
- Crabtree MB, Sang RC, Stollar V, Dunster LM, Miller BR. Genetic and phenotypic characterization of the newly described insect flavivirus, Kamiti River virus. *Arch Virol* 2003;148:1095–118. doi:10.1007/s00705-003-0019-7.
- Crochu S, Cook S, Attoui H, Charrel RN, De Chesse R, Belhouchet M, et al. Sequences of flavivirus-related RNA viruses persist in DNA form integrated in the genome of *Aedes* spp. mosquitoes. *J Gen Virol* 2004;85:1971–80. doi:10.1099/vir.0.79850-0.
- Curto S, Boffi R, Carbajo AE, Plastina R, Schweigmann N. Reinfestación del territorio argentino por *Aedes aegypti*. Distribución geográfica (1994-1999). In: Salomon OD, editor. Actual. en Artropodología Sanit. Argentina. Publicació, Buenos Aires: 2002, p. 127–37.
- Díaz LA, Occelli M, Almeida FL, Almirón WR, Contigiani MS. Eared Dove (*Zenaida auriculata*, Columbidae) as Host for St. Louis Encephalitis Virus (Flaviviridae, Flavivirus). *Vector-Borne Zoonotic Dis* 2008;8:277–82. doi:10.1089/vbz.2007.0168.
- Díaz LA, Nemeth NM, Bowen RA, Almirón WR, Contigiani MS. Comparison of Argentinean Saint Louis encephalitis virus non-epidemic and epidemic strain infections in an avian model. *PLoS Negl Trop Dis* 2011;5:1–7. doi:10.1371/journal.pntd.0001177.
- Díaz LA, Llinás G, Vázquez A, Tenorio A, Contigiani MS. Silent circulation of St. Louis encephalitis virus prior to an encephalitis outbreak in Córdoba, Argentina (2005). *PLoS Negl Trop Dis* 2012;6. doi:10.1371/journal.pntd.0001489.
- Díaz LA, Flores FS, Quaglia A, Contigiani MS. Intertwined arbovirus transmission activity: Reassessing the transmission cycle paradigm. *Front Physiol* 2013;3 JAN:1–7. doi:10.3389/fphys.2012.00493.
- Dobzhansky T. Genetics and the origin of species. New York: Columbia University Press; 1937.
- Dominguez C, Lagos S. Presencia de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) en la provincia de Mendoza, Argentina. *Rev Soc Entomol Argent* 2001;60:79–80.
- Farfan-Ale JA, Loroño-Pino MA, García-Rejon JE, Hovav E, Powers AM, Lin M, et al. Detection of RNA from a novel West Nile-like virus and high prevalence of an insect-specific flavivirus in mosquitoes in the Yucatan Peninsula of Mexico. *Am J Trop Med Hyg* 2009;80:85–95.
- Fernandez-Garcia M-D, Mazzon M, Jacobs M, Amara A. Pathogenesis of flavivirus infections: using and abusing the host cell. *Cell Host Microbe* 2009;5:318–28. doi:10.1016/j.chom.2009.04.001.
- Forattini OP. Culicidología médica. Editora da Universidade de São Paulo; 2002.
- Forrester NL, Coffey LL, Weaver SC. Arboviral bottlenecks and challenges to maintaining diversity and fitness during mosquito transmission. *Viruses* 2014;6:3991–4004. doi:10.3390/v6103991.
- Forrester N, Coffey L, Weaver S. Correction: Forrester, N.L.; Coffey, L.L.; Weaver, S.C. Arboviral Bottlenecks and Challenges to Maintaining Diversity and Fitness during Mosquito Transmission. *Viruses* 2014, 6, 3991–4004. *Viruses* 2014;6:4422–3. doi:10.3390/v6114422.
- Garrett-Jones C. Prognosis for Interruption of Malaria Transmission Through Assessment of the Mosquito's Vectorial Capacity. *Nature* 1964;204:1173–5. doi:10.1038/2041173a0.

Gaudino N. Dengue. Rev Sanid Mil Argentina 1916;15:617–27.

Genus: Flavivirus - Flaviviridae - Positive-sense RNA Viruses - International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). n.d. https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_online_report/positive-sense-rna-viruses/w/flaviviridae/360/genus-flavivirus (accessed August 30, 2018).

Goenaga S, Fabbri CM, García JB, Rondán JC, Gardenal N, Calderón GE, et al. New strains of Culex flavivirus isolated in Argentina. J Med Entomol 2014;51:900–6.

Gubler DJ. The Global Emergence / Resurgence of Arboviral Diseases As Public Health Problems. Arch Med Res 2002;33:330–42. doi:10.1016/S0188-4409(02)00378-8.

Hardy JL, Houk EJ, Kramer LD, Reeves WC. Intrinsic Factors Affecting Vector Competence of Mosquitoes for Arboviruses. Annu Rev Entomol 1983;28:229–62. doi:10.1146/annurev.en.28.010183.001305.

Higgs S, Beaty BJ. Natural Cycles of Vector-Borne pathogens. In: Marquardt W, editor. Biol. Dis. Vectors. Second, USA: Elsevier Academic Press; 2004, p. 167–84.

Holzmann I, Agostini I, Areta JJ, Ferreyra H, Beldomenico P, Di Bitetti MS. Impact of yellow fever outbreaks on two howler monkey species (Alouatta guariba clamitans and A. caraya) in Misiones, Argentina. Am J Primatol 2010;72:475–80. doi:10.1002/ajp.20796.

Hoshino K, Isawa H, Tsuda Y, Yano K, Sasaki T, Yuda M, et al. Genetic characterization of a new insect flavivirus isolated from Culex pipiens mosquito in Japan. Virology 2007;359:405–14. doi:10.1016/j.virol.2006.09.039.

Kenney JL, Brault AC. The Role of Environmental , Virological and Vector Interactions in Dictating Biological Transmission of Arthropod-Borne Viruses by Mosquitoes. vol. 89. 1st ed. Elsevier Inc.; 2014. doi:10.1016/B978-0-12-800172-1.00002-1.

Kim DY, Guzman H, Bueno R, Dennett JA, Auguste AJ, Carrington CVF, et al. Characterization of Culex Flavivirus (Flaviviridae) strains isolated from mosquitoes in the United States and Trinidad. Virology 2009;386:154–9. doi:10.1016/j.virol.2008.12.034.

Kramer LD. Complexity of virus - vector interactions. Curr Opin Virol 2016;81–6. doi:10.1016/j.coviro.2016.08.008.

Kuno G, Chang GJ, Tsuchiya KR, Karabatsos N, Cropp CB. Phylogeny of the genus Flavivirus. J Virol 1998;72:73–83. doi:10.1006/mpev.2000.0874.

Kuno G. Transmission of arboviruses without involvement of arthropod vectors. Acta Virol 2001;45:139–50. Kuno G. Dengue Transmission without Involvement of Mosquito Vector. Clin Infect Dis 2005;40:774–5. doi:10.1086/427947.

Kuno G, Chang GJ. Biological Transmission of Arboviruses: Reexamination of and New Insights into Components , Mechanisms , and Unique Traits as Well as Their Evolutionary Trends. Clin Microbiol Rev 2005;18:608–37. doi:10.1128/CMR.18.4.608.

Lequime S, Paul RE, Lambrechts L. Determinants of Arbovirus Vertical Transmission in Mosquitoes. PLoS Pathog 2016;12:e1005548. doi:10.1371/journal.ppat.1005548.

Lindenbach BD, Rice CM. Flaviviridae: The Viruses and Their Replication. Fields Virol 2007;20:1101–51. doi:10.1016/0038-092X(88)90131-4.

Lobo FP, Mota BEF, Pena SDJ, Azevedo V, Macedo AM, Tauch A, et al. Virus-host coevolution: Common patterns of nucleotide motif usage in Flaviviridae and their hosts. PLoS One 2009;4.

doi:10.1371/journal.pone.0006282.

Machado DC, Mondini A, dos Santos Santana V, Yonamine PTK, Chiaravalloti Neto F, de Andrade Zanotto PM, et al. First identification of *Culex flavivirus* (Flaviviridae) in Brazil. *Intervirology* 2012;55:475–83. doi:10.1159/000337166.

Marin MS, Zanotto PM, Gritsun TS, Gould EA. Phylogeny of TYU, SRE, and CFA virus: different evolutionary rates in the genus *Flavivirus*. *Virology* 1995;206:1133–9.

Mavale MS, Geevarghese G, Ghodke YS, Fulmali P V, Singh A, Mishra AC. Vertical and venereal transmission of *Chandipura virus* (Rhabdoviridae) by *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol* 2005;42:909–11.

Mavale M, Parashar D, Sudeep A, Gokhale M, Ghodke Y, Geevarghese G, et al. Venereal transmission of *chikungunya virus* by *Aedes aegypti* mosquitoes (Diptera: Culicidae). *Am J Trop Med Hyg* 2010;83:1242–4. doi:10.4269/ajtmh.2010.09-0577.

Mayr E. *Systematics and the origin of species*. New York: Columbia University Press; 1942.

Ministerio de Salud de la Nación. Boletín de notificación de casos de dengue al 11 de junio de 2009. 2009.

Ministerio de Salud de la Nación. Boletín Integrado de Vigilancia. 2016.

Ministerio de Salud de la Nación. Situación de Dengue en Argentina. Parte de prensa N°23, con actualización de datos al 30/05/2010. 2010.

Morales-Betoulle ME, Monzón Pineda ML, Sosa SM, Panella N, López MRB, Cordón-Rosales C, et al. *Culex flavivirus* isolates from mosquitoes in Guatemala. *J Med Entomol* 2008;45:1187–90. doi:10.1603/0022-2585(2008)45[1187:CFIFMI]2.0.CO;2.

Morales MA, Barrandeguy M, Fabbri C, Garcia JB, Vissani A, Trono K, et al. West Nile virus isolation from equines in Argentina, 2006. *Emerg Infect Dis* 2006;12:1559–61. doi:10.3201/eid1210.060852.

Mosquito Taxonomic Inventory. 2018. <http://mosquito-taxonomic-inventory.info/> (accessed November 7, 2018).

Moureaux G, Cook S, Lemey P, Nougaiere A, Forrester NL, Khasnatinov M, et al. New insights into flavivirus evolution, taxonomy and biogeographic history, extended by analysis of canonical and alternative coding sequences e0117849. *PLoS One* 2015;10. doi:10.1371/journal.pone.0117849.

Mullen GR (Gary R, Durden LA. *Medical and veterinary entomology*. Elsevier; 2009.

Organización Panamericana de la Salud. CD1.R1: Continental *Aedes Aegypti* eradication 1947.

Oria GI, Spinsanti LI, Pirota VL, Martinez F, Stechina OS, Etchepare E, et al. Seroprevalence of *Flavivirus* in horses in Chaco, Argentina. Circulation during 2013–2014. *Brazilian J Vet Med* 2018;40:1–10. doi:10.29374/2527-2179.bjvm045118.

Ovenden JR, Mahon RJ. Venereal transmission of *Sindbis virus* between individuals of *Aedes australis* (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol* 1984;21:292–5.

Pena CJ, Gonzalez G, Chadee DD. Seasonal prevalence and container preferences of *Aedes albopictus* in Santo Domingo City, Dominican Republic. *J Vector Ecol* 2003;28:208–12.

Pereira-Silva JW, Nascimento VA do, Belchior HCM, Almeida JF, Pessoa FAC, Naveca FG, et al. First evidence of Zika virus venereal transmission in *Aedes aegypti* mosquitoes. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2017;113:56–61. doi:10.1590/0074-02760170329.

- Reisen WK, Fang Y, Brault AC. Limited interdecadal variation in mosquito (Diptera: Culicidae) and avian host competence for western equine encephalomyelitis virus (Togaviridae: Alphavirus). *Am J Trop Med Hyg* 2008;78:681–6. doi:78/4/681 [pii].
- Rivarola ME, Tauro LB, Llinás GA, Contigiani MS. Virulence variation among epidemic and non-epidemic strains of Saint Louis encephalitis virus circulating in Argentina 2014;109:197–201. doi:10.1590/0074-0276130475.
- Rosen L. Sexual Transmission of Dengue Viruses by *Aedes Albopictus*. *Am J Trop Med Hyg* 1987;37:398–402. doi:10.4269/ajtmh.1987.37.398.
- Rosen L. Further Observations on the Mechanism of Vertical Transmission of Flaviviruses by *Aedes* Mosquitoes. *Am J Trop Med Hyg* 1988;39:123–6. doi:10.4269/ajtmh.1988.39.123.
- Rossi GC, Pascual NT, Krsticevic FJ. First record of *Aedes albopictus* (Skuse) from Argentina. *J Am Mosq Control Assoc* 1999;15:422.
- Rossi GC, Lestani EA, D’Oria M j. Nuevos registros y distribución de mosquitos de la Argentina (Diptera : Culicidae) (Diptera : Culicidae). *Rev La Soc Entomológica Argentina* 2006;65:51–6. doi:10.1155/2013/298012.
- Rossi GC. Annotated checklist, distribution, and taxonomic bibliography of the mosquitoes (Insecta: Diptera: Culicidae) of Argentina. *Check List* 2015;11:1–15. doi:10.15560/11.4.1712.
- Sabattini MS, Avilés G, Monath TP. Historical, epidemiological and ecological aspects of arbovirus in Argentina: Togaviridae, Alphavirus. In: Travassos da Rosa A, da Costa Vasconcelos PF, Travassos da Rosa J, editors. *Overv. arbovirology Brazil Neighb. Ctries.*, Belém: Instituto Evandro Chagas; 1998, p. 135–52.
- Saiyasombat R, Dorman KS, Garcia-Rejon JE, Loroño-Pino MA, Farfan-Ale JA, Blitvich BJ. Isolation and sequence analysis of *Culex flavivirus* from *Culex interrogator* and *Culex quinquefasciatus* in the Yucatan Peninsula of Mexico. *Arch Virol* 2010;155:983–6. doi:10.1007/s00705-010-0665-5.
- Sánchez-Vargas I, Harrington LC, Doty JB, Black WC, Olson KE, Olson KE. Demonstration of efficient vertical and venereal transmission of dengue virus type-2 in a genetically diverse laboratory strain of *Aedes aegypti*. *PLoS Negl Trop Dis* 2018;12:e0006754. doi:10.1371/journal.pntd.0006754.
- Sang RC, Gichogo A, Gachoya J, Dunster MD, Ofula V, Hunt AR, et al. Isolation of a new flavivirus related to Cell fusing agent virus (CFAV) from field-collected flood-water *Aedes* mosquitoes sampled from a dambo in central Kenya. *Arch Virol* 2003;148:1085–93. doi:10.1007/s00705-003-0018-8.
- Simmonds P, Becher P, Bukh J, Gould EA, Meyers G, Monath T, et al. ICTV Virus Taxonomy Profile: Flaviviridae ICTV VIRUS TAXONOMY PROFILES. *J Gen Virol* 2017;98:2–3. doi:10.1099/jgv.0.000672.
- Spinsanti LI, Díaz LA, Glatstein N, Arselán S, Morales MA, Farías AA, et al. Human outbreak of St. Louis encephalitis detected in Argentina, 2005. *J Clin Virol* 2008;42:27–33. doi:10.1016/j.jcv.2007.11.022.
- Thompson WH, Beaty BJ. Venereal transmission of La Crosse (California encephalitis) arbovirus in *Aedes triseriatus* mosquitoes. *Science* 1977;196:530–1.
- Vezzani D, Carbajo AE. *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus*, and dengue in Argentina: current knowledge and future directions. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2008;103:66–74. doi:10.1038/385283a0.
- Weaver SC. Vector biology in viral pathogenesis. In: Neal N, editor. *Viral Pathog*. Raven, New York: 1997, p. 329–52.

Zanotti G, De Majo MS, Alem I, Schweigmann N, Campos RE, Fischer S. New records of *Aedes aegypti* at the southern limit of its distribution in Buenos Aires province, Argentina. *J Vector Ecol* 2015;40:408–11. doi:10.1111/jvec.12181.

CAPÍTULO II

*Caracterización de la comunidad de culícidos y su
variación espacio-temporal en diferentes ambientes de
la ciudad de Resistencia, Chaco*

Entre los factores que se han asociado a los cambios de distribución de las especies de Culicidae podemos mencionar: i) aumento en la densidad poblacional humana, y como consecuencia, mayor urbanización, desarrollo industrial, aumento en las actividades agro-ganaderas, deforestación y ocupación de ambientes silvestres; ii) transporte aéreo, marítimo y terrestre de personas, animales y productos; iii) factores climáticos, como los intervalos térmicos, de humedad, precipitación y radiación (Gould et al., 2017; Stein et al., 2016).

Entre estos, los factores climáticos, (intervalos térmicos, de humedad, lluvias y de radiación) relacionados a la fenología de los insectos (ritmos internos) y fisiología, son de gran importancia (Stein et al., 2016). El aumento de la temperatura y la variación en el reparto de las precipitaciones, asociadas al cambio climático, podrían ampliar o disminuir la distribución de las especies, consecuencia de la modificación de su hábitat (Gould et al., 2017; Stein et al., 2016). Aunque cada especie responde de manera individual a dicho cambio, los ciclos biológicos en particular de los mosquitos son muy sensibles a estas variaciones (Stein et al., 2016).

En Argentina están citadas 246 especies de mosquitos distribuidas en 23 provincias (Rossi, 2015; Stein et al., 2018), donde la región del noreste presenta la mayor riqueza (86,47% de especies representadas) respondiendo a la mayor oferta de hábitats (Rossi, 2015; Stein et al., 2016).

Existen especies adaptadas a los hábitats relativamente estables, siendo muy sensibles a las modificaciones ambientales causadas por el hombre (Stein et al.,

2016), las mismas presentan una distribución restringida a los ambientes selváticos de la región del NOA y NEA. Asimismo, otra barrera en la distribución de estas especies es la temperatura, ya que no son halladas durante las épocas frías en el área subtropical (Stein et al., 2016) y tampoco se encuentran en áreas templadas con hábitats similares (Ludueña Almeida et al., 1995b, 1995a; Maciá et al., 1995).

Otras especies, presentan una amplia distribución, como ser *Ae. albifasciatus* (Macquart), detectándose en todas las provincias de Argentina a excepción de San Juan y San Luis (Rossi, 2015), y en el área subtropical se la detectó principalmente en invierno (Stein et al., 2016, 2013). *Aedes aegypti* se encuentra desde el norte de Argentina hasta la provincia de Neuquén (Rossi, 2015). Los mosquitos *Culex* (*Culex*) también presentan un amplio rango de distribución, algunas especies ocupan áreas más templadas y otras más subtropicales, existiendo híbridos en la región Centro de Argentina (Stein et al., 2016).

En Argentina, estudios sobre la variación estacional o patrones estacionales de culícidos adultos se iniciaron en la década del '70 (S. XX), con el trabajo de Hack et al., (1978) en la provincia de Corrientes. Tres años después, Balseiro (1981) presenta los patrones de actividad estacional y fluctuación horaria en la actividad nocturna de dos especies, *Cx. eduardoi* Casal & García y *Ae. crinifer* (Theobald), el mismo autor presenta posteriormente la actividad diaria de culícidos en un ambiente silvestre, trabajo en el que desarrolla brevemente asociaciones entre especies e interacciones de algunas especies con las variables climáticas (Balseiro, 1989). Ronderos et al., (1992) analiza la composición específica y los cambios

estacionales de una comunidad de culícidos en un ambiente silvestre de la provincia de Buenos Aires. Otro trabajo, con comunidades de culícidos y su asociación con las variables climáticas fue realizado por (Almirón et al., 1995) en áreas periféricas de la ciudad de Córdoba. Loetti et al. (2007) estudió los patrones de actividad estacional de mosquitos atraídos por cebo humano en la Isla Santa Clara, provincia de Buenos Aires.

Entre otros trabajos realizados sobre variación estacional y asociación con las variables climáticas que tienen en cuenta una o pocas especies podemos mencionar: Ludueña et al. (1995) y Fava et al. (2001) con *Ae. albifasciatus* en la provincia de Córdoba; *Cx. dolosus* (Lynch Arribalzaga), *Cx. maxi* Dyar, *Cx. pipiens* Linnaeus, *Ae. albifasciatus*, *Mansonia titillans* (Walker) y *Ma. indubitans* Dyar & Shannon (Campos et al., 1993) colectados en áreas periféricas de la ciudad de La Plata. Culícidos colectados en una zona de pastizales, pajonales y selva en galería (Reserva Natural de Punta Lara) de la provincia de Buenos Aires son *Ae. albifasciatus*, *Ae. crinifer*, *Cx. dolosus*, *Cx. maxi* y *Cx. intricatus* Brethes (Maciá et al., 1997, 1995) y *Psorophora* spp. (Campos et al., 1995).

Trabajos realizados con culícidos adultos en la provincia de Chaco son escasos. En la ciudad de Resistencia, Stein et al. (2005, 2013) describe la actividad de oviposición de hembras de *Ae. aegypti*, y también la selección de hospedadores animal y humano por culícidos, y la estructura de comunidades de culícidos y su distribución espacio-temporal en tres ambientes con diferente grado de antropización en la provincia de Chaco (Stein et al., 2016).

El estudio de la variación estacional y espacial de las especies es uno de los aspectos más importantes para comprender las enfermedades transmitidas por artrópodos, haciendo posible identificar la época de mayor abundancia de los vectores, y además poder identificar los periodos más propicios para el manejo de los mismos (Lourenço de Oliveira et al., 1985). Por tal motivo y con la intención de contribuir al conocimiento de la variación espacio-temporal de culícidos de Resistencia, en el presente capítulo se pretende, 1) caracterizar la comunidad de culícidos colectados en los diferentes sitios de la ciudad y 2) describir los patrones de actividad temporal de los mismos, haciendo especial hincapié en mosquitos *Culex (Culex) spp.* y *Aedes aegypti*, colectados en ciudad y su asociación con las variables ambientales.

DESCRIPCIÓN DEL ÁREA DE ESTUDIO

La ciudad de Resistencia (27°27'S 58°59'W) (Figura 1), localizada al noreste del Departamento San Fernando, es capital de la Provincia de Chaco, Argentina. Se encuentra emplazada en el valle de inundación del Río Paraná, surcada por los ríos Negro y Arazá que desembocan en el mismo. En su interior presenta una serie de lagunas semilunares, producto de meandros abandonados del río Negro, las cuales completan el sistema fluvio-lacustre local (Alberto, 2007; Muscar Benasayag et al., 1992).

Se encuentra ubicada en la ecorregión Gran Chaco, en la subregión Chaco Húmedo, se caracteriza por presentar un mosaico de franjas de tierras altas boscosas que alternan con zonas bajas de esteros y cañadas (Alberto, 2004).

El clima es subtropical cálido, en la estación de verano, la temperatura anual media es de 27°C, con un máximo que puede exceder los 43°C. Durante el invierno la temperatura media anual es de 15°C (Bruniard, 1978).

Las lluvias en esta subregión Chaco Húmedo van de 1.200 mm a 1.400 mm anuales, lo que determina que esta subregión tenga una gran diversidad biológica (Naumann, 2006). El régimen pluviométrico es mayor desde el mes de noviembre hasta el mes de abril, con doble máximo (noviembre y marzo) que se corresponden con la estación primavera (septiembre- noviembre) y especialmente acentuado en el otoño (marzo- mayo) (Bruniard, 1978).

El censo realizado en el año 2010 informó para la ciudad de Resistencia 290.723 habitantes, distribuidos en 108.706 hogares. La cobertura urbana de la ciudad de Resistencia ocupa unos 17,7% del territorio total de la ciudad de Resistencia, a lo cual debemos adicionar la vegetación asociada a ella que comprende unos 11,2% de ocupación, distinguiendo así el espacio real que comprende el área urbana (28,9 %) (Da Silva et al., 2014).

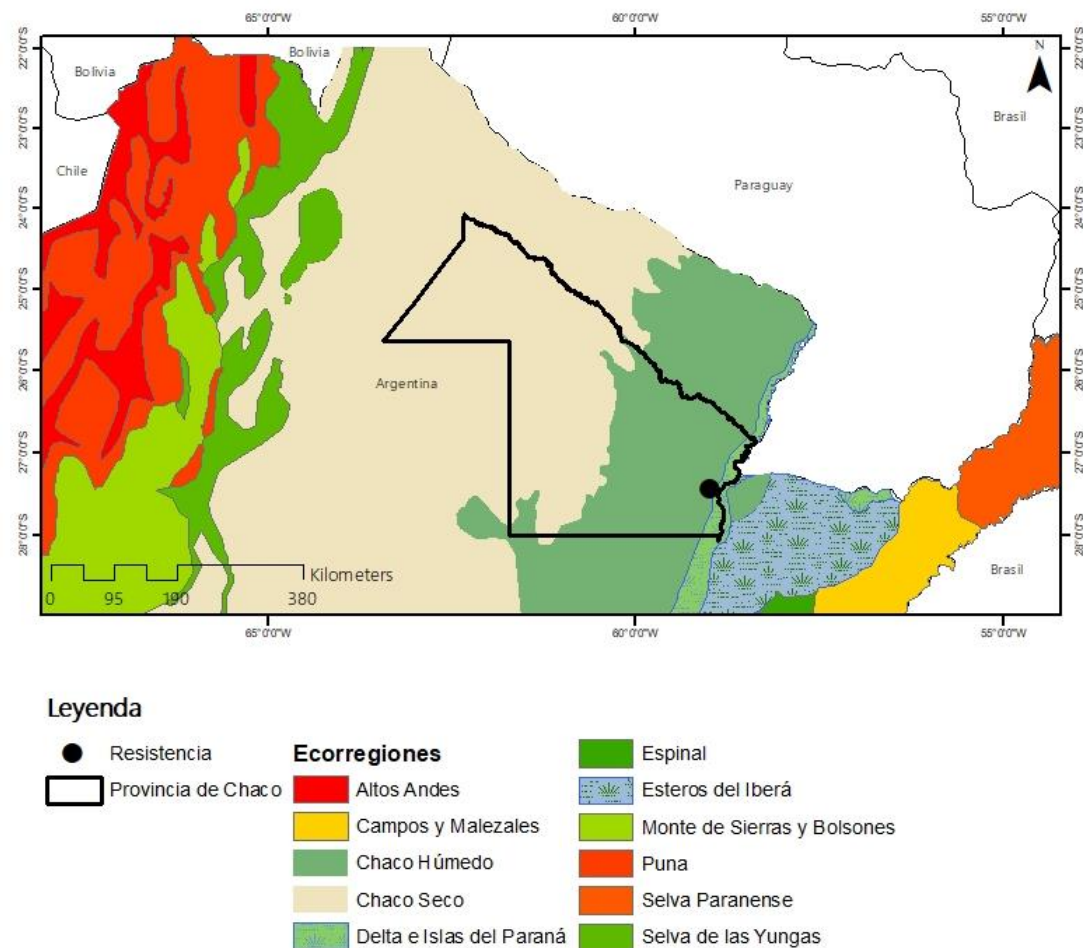


Figura 1: Mapa ubicando la provincia de Chaco y el área de estudio.

SITIOS DE MUESTREO

Ambiente Urbano

Actualmente, el trazado de la trama urbana de la ciudad de Resistencia, es el resultado de un complejo paisaje caracterizado por la heterogeneidad socioeconómica y demográfica, consecuencia de la expansión urbana acelerada, avanzando sin contar con los servicios esenciales y controles municipales (Alberto, 2014; Foschiatti, 2003). En este ambiente se seleccionaron dos sitios para la captura de mosquitos adultos (Figura 2).



Figura 2: Mapa de Resistencia con la ubicación de los sitios de muestreo.

Sitio Regimiento: Se encuentra ubicado en el barrio La Liguria con una orientación sur en relación al mismo ($27^{\circ}28'55,15''S$ - $58^{\circ}57'30,68''O$) (Figura 3). El predio es un área de 935.736 m² delimitada por las avenidas 9 de julio en su frente, Juan José Castelli en contrafrente. Las Avenidas España (noroeste) y Arribáizaga (sureste) definen sus límites laterales.



Figura 3: Ubicación del sitio de muestreo Regimiento.

Este predio pertenece a la Base Logística Resistencia del Ejército Argentino y se caracteriza por presentar en la trama urbana extensas áreas con vegetación tipo pastizal, en algunos casos se observó pequeñas superficies con acumulación de agua (característico de la zona por el tipo de suelo y pendiente), zanjas con agua pluvial y vegetación bordeando las cuadras, áreas de suelo desnudo y lagunas permanentes con vegetación. Para evaluar la cantidad de habitantes cercanos al

sitio de muestreo se seleccionaron 6 radios censales, abarcando un área de 0,013 km² con 4364 habitantes (Figura 2). Las trampas fueron colocadas en un área de 273.498,50m² aproximadamente (Figura 3).

Sitio Vialidad: Se encuentra en la Villa Pegoraro con una orientación sureste en relación a la plaza central 25 de Mayo de Resistencia (27°26'18,60"S - 59°0'49,48"O) (Figura 4). Es un área de 18.211,08 m², limitada por la calle Pereyra en el frente y la ruta Nacional N° 11 en su contrafrente. Su límite lateral suroeste está delimitado por la Avenida Alvear y su límite noreste por otro predio. El área seleccionada para la colocación de trampas (de aproximadamente 9000 m²) estaba destinada al guardado de la maquinaria utilizada por Vialidad Nacional.



Figura 4: Ubicación del sitio de muestreo Vialidad.

El sitio se caracterizó por extensas áreas de suelo desnudo, presentaba parches con vegetación tipo pastizal y arbórea, se observó acumulación de agua en restos de vehículos abandonados, literas sin techo, charcos de agua temporales formados en las huellas de los vehículos de gran porte que se guardan durante la noche. Vegetación bordeando las cuadras con zanjas con agua pluvial y a 600 metros lagunas permanentes con vegetación. Para estimar el número de habitantes en las proximidades del sitio se seleccionaron 3 radios censales (1175, 1147 y 1174) de 0,64 km² con 2518 habitantes, lo que correspondería a 3934 habitantes aproximadamente por km² (Figura 2).

Ambiente Semiurbano

Sitio Monte Alto: Próximo al valle de inundación del río Parará, en el área baja del barrio San Buenaventura de Monte Alto (27°26'44,50''S - 58°55'4,82'' O) (Figura 5), el ambiente presenta relictos de bosque de Quebracho Colorado Chaqueño (*Schinopsis balansae*) y Urunday (*Astronium balansae*), palmares de *Copernicia alba* en transición con bosques bajos de espinillos (*Prosopis AlgarroBILLA Gris*) y aromito (*Acacia caven*) (Alberto 2004); en el que se observaron, rastros de pastoreo, pisoteo y troncos cortados, depresiones del suelo con agua y abundante vegetación durante todas las estaciones de muestreo. Los habitantes de la vivienda más próxima practican actividades plantación de hortalizas y cría de animales de granja. Actualmente, el ambiente se encuentra en un proceso de urbanización discontinua (para-urbanización) dando como resultado un ambiente heterogéneo con una multitud de usos (parques, quintas semiurbanizadas, cementerios,

actividades de cría de animales y cultivo). La densidad poblacional es de 115 personas por km² (Figura 2). A este sitio se accede por la ruta Nacional N° 16 camino a Corrientes capital y a 8 km de la ciudad de Resistencia.

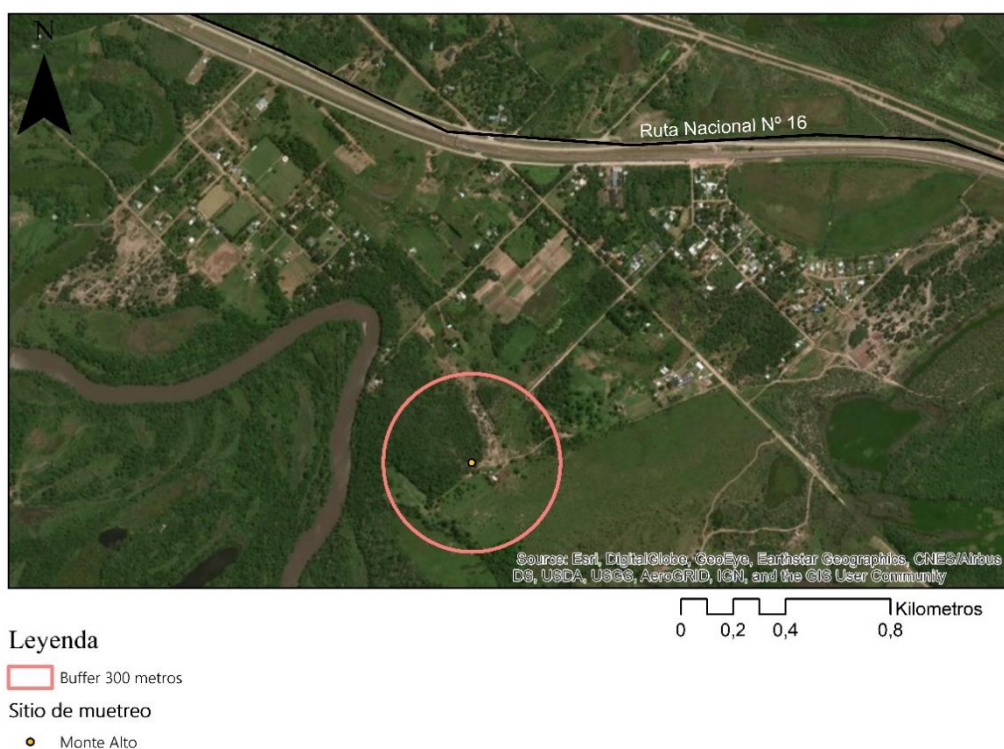


Figura 5: Ubicación del sitio de muestreo Monte Alto.

CAPTURA E IDENTIFICACIÓN DE MOSQUITOS ADULTOS

Se colectaron mosquitos adultos de manera estacional desde otoño del año 2013 hasta la primavera del año 2015 (Tabla 1). Para la captura de mosquitos adultos se utilizaron 4 trampas de luz tipo CDC suplementadas con hielo seco por sitio, las cuales permanecieron activas desde las 18:00 hs hasta las 09:00 hs del día siguiente

con el objetivo de coleccionar mosquitos de hábitos crepusculares, nocturnos y diurnos.

Año	2013		2014			2015		
Mes	May	Nov	Mar	May	Nov	Mar	Abr	Nov
Estación climática	Otoño	Primavera	Verano	Otoño	Primavera	Verano	Otoño	Primavera
Monte Alto	X	X	X	X	X	X	X	
Regimiento	X	X	X		X	X	X	
Vialidad				X	X	X	X	X

Tabla 1: Cronograma de colectas de culicidos realizadas en la ciudad de Resistencia durante los años 2013, 2014 y 2015. Durante el otoño 2014 y primavera 2015 algunos sitios no fueron muestreados.

Los mosquitos colectados en su malla colectora se colocaron dentro de una conservadora conteniendo hielo seco y se transportaron refrigerados al laboratorio. En el laboratorio, los mosquitos eutanizados en frío, se determinaron taxonómicamente bajo platina refrigerada, agrupándose en pools por especie, sexo, sitio, fecha de colecta y estado alimentario (alimentado con sangre, no alimentado con sangre). Para la determinación de las especies de Culicidae, se utilizaron las claves taxonómicas de Darsie (1985) y Consoli et al. (1994). Para las abreviaciones de géneros y subgéneros se siguió la propuesta de Reinert (2000). Posteriormente se colocaron en tubos plásticos estériles etiquetados y se almacenaron a -70 °C hasta el momento de su procesamiento para detección viral.

ANÁLISIS DE LOS DATOS

1. CARACTERIZACIÓN DE LAS COMUNIDADES DE MOSQUITOS EN LOS DIFERENTES AMBIENTES.

Para alcanzar el objetivo se trabajó con la totalidad de los mosquitos colectados en tres sitios desde otoño del año 2013 hasta la primavera 2015.

a. Métodos para evaluar la diversidad alfa

Teniendo en cuenta que una de las estrategias comúnmente empleadas para medir la diversidad es conocer las especies que hay en un área, se cuantificó el número de especies por sitio (riqueza específica-S).

Se determinó la diversidad por medio de la fórmula propuesta por Jost (2006), quien incorporó el término de diversidad verdadera:

$${}^qD = \left(\sum_{i=1}^S p_i^q \right)^{1/(1-q)}$$

donde qD es la diversidad verdadera, p_i es la abundancia relativa — abundancia proporcional— de la especie i , S es el número de especies y q es el orden de la diversidad y define la sensibilidad del índice a las abundancias relativas de las especies (García-Morales et al., 2011; Jost, 2007, 2006; Moreno et al., 2011; Tuomisto, 2010a, 2010b). El valor del parámetro q determina qué tanto influyen las especies comunes o las especies raras en la medida de la diversidad (Hill 1973). Para este trabajo, la diversidad verdadera utilizada fue de orden 1 (1D), en la cual todas las especies son consideradas con un valor de diversidad proporcional a su abundancia en la comunidad (Jost, 2006, 2007; Tuomisto, 2010a, 2010b; Moreno et al., 2011). El resultado se expresa como el “número de especies efectivas” (Jost,

2006). Esta forma de expresar la diversidad de una comunidad, cumple con la propiedad de duplicación expuesta por Hill (1973). Esto posibilita unificar el análisis haciendo comparable los resultados de diversidad y también obtener una interpretación directa y más sencilla sobre cuál es la diferencia en la diversidad de 2 o más comunidades (Jost, 2007, 2010; Moreno et al., 2011). La diferencia en la diversidad verdadera entre 2 comunidades, también se expresó como el cociente, entre la de mayor diversidad respecto a la de menor diversidad. De esta forma, se puede ver cuánto más diversa es una comunidad comparada con otra. Otra forma de presentarla fue, como el porcentaje de diversidad que representa la comunidad de menor respecto a la de mayor diversidad (Moreno et al., 2011).

Para evaluar la completitud de las muestras, se efectuó una predicción de la riqueza específica, como una función de la acumulación de especies (Colwell et al., 1994) por medio del estimador de riqueza no paramétrico ACE. Además, se calculó el comportamiento de las especies únicas (singletons) y duplicadas (doubletons). Estos análisis se realizaron con el software EstimateS versión v9.1.0 (<http://purl.oclc.org/estimates>; Colwell, 2009).

Para comparar la composición, abundancia y uniformidad de especies entre sitios, se realizaron curvas de rango-abundancia. Para esto, se graficó la abundancia relativa de las especies contra el rango ocupado por cada especie desde la de mayor a la de menor abundancia.

b. Método para evaluar la diversidad beta

Para analizar el grado de reemplazo y la ocurrencia conjunta de especies entre las unidades de muestreo se utilizó el índice de complementariedad (C_{AB}) propuesto por Colwell y Coddington (1994). Así, la complementariedad varía desde cero, cuando ambos sitios son idénticos en composición de especies, hasta uno, cuando las especies de ambos sitios son completamente distintas.

Con el fin de observar el tipo de agrupamiento entre los sitios, se realizó un dendrograma de similitud en base al índice de Jaccard, con el método del ligamiento no ponderado (UPGMA). Estos análisis se realizaron con el software de acceso libre Past versión 3.0 (<http://folk.uio.no/ohammer/Past>; Hammer et al., 2001).

c. Categoría de dominancia (CD).

Se calculó para cada especie la categoría de dominancia: eudominante ($CD > 10\%$), dominante ($5\% < CD \leq 10\%$), subdominante ($2\% < CD \leq 5\%$), eventual ($1\% < CD \leq 2\%$) o rara ($CD \leq 1\%$) (Cardoso et al., 2011), de acuerdo a la abundancia relativa del total de especies identificadas en el área de estudio.

2. PATRONES DE ACTIVIDAD TEMPORAL DE MOSQUITOS Y VARIABLES CLIMÁTICAS

El análisis de la actividad de los mosquitos por estación y su relación con las variables climáticas fue considerado en dos períodos, el primer período comprende desde la primavera 2013 al otoño 2014 y el segundo período comprende desde la primavera 2014 al otoño 2015, es decir que se tomaron en cuenta únicamente los períodos de mayor actividad que estuvieran completos (desde primavera hasta

otoño). No se consideraron para este análisis otoño 2013 y primavera 2015, por representar el fin y el inicio de dos períodos. Para evaluar si existen diferencias estadísticamente significativas entre las variables climáticas de las estaciones de los dos períodos se realizó un análisis de la varianza (ANAVA). Previamente al análisis de la varianza se comprobaron los supuestos de normalidad.

Las variables climáticas consideradas en el análisis fueron la temperatura máxima y mínima, promediada por mes y expresadas en grados Celsius, las precipitaciones acumuladas por mes y expresadas en milímetros cúbicos. La variable humedad relativa fue promediada desde el momento de colocación de la trampa (18hs) hasta que la misma es retirada (9hs). Para una mejor visualización las variables climáticas (temperatura máxima, media, mínima, y las precipitaciones) fueron graficadas por mes desde primavera 2013 hasta otoño 2015. Además, se consideró la abundancia total de las especies de mosquitos sin discriminar por sitio debido a que los datos de las variables climáticas consideradas son los mismos provenientes de la estación meteorológica Aeropuerto Resistencia, del Servicio Meteorológico Nacional.

Para evaluar si existe relación entre las variables climáticas y las abundancias de los mosquitos se realizó un análisis de correlación utilizando el coeficiente de Spearman, dado que los datos no poseen distribución normal.

COMUNIDAD DE CULÍCIDOS EN DIFERENTES AMBIENTES DE LA CIUDAD DE RESISTENCIA

De los muestreos realizados, se colectaron un total de 15.997 mosquitos, determinándose 61 especies pertenecientes a los géneros *Aedeomyia*, *Aedes*, *Anopheles*, *Coquillettidia*, *Culex*, *Mansonia*, *Psorophora*, *Uranotaenia* y *Wyeomyia*. Algunos individuos solo pudieron ser determinados a nivel de subgénero representando el 30,95% del total de individuos (Tabla 2 en anexo).

El género mejor representado en relación al número de individuos capturados en todo el período de muestreo fue *Culex* con un 36,05%, seguido por los géneros *Aedes* (31,42%) y *Mansonia* (19,90%). Los géneros *Psorophora*, *Anopheles*, *Coquillettidia*, *Aedeomyia*, *Wyeomyia* y *Uranotaenia* se capturaron en porcentajes menores al 5% en orden decreciente. El género *Culex* además presentó mayor riqueza específica con 17 especies de 61 totales, seguido por el género *Psorophora* con 13 especies (Tabla 2 en anexo).

En relación a la riqueza específica y abundancia por sitio de muestreo, el sitio Monte Alto presentó mayor riqueza y abundancia ($S=58$; 7102 individuos) comparado con los sitios Regimiento ($S=47$; 6512 individuos) y Vialidad ($S=31$; 2383 individuos) (Tabla 3). Por otra parte, respecto a la diversidad verdadera, se observó la misma tendencia. La mayor diversidad se registró en el sitio Monte Alto (${}^1D=12,566$ especies efectivas), siendo 1,02 veces más diverso que el sitio Regimiento (${}^1D=12,30$ especies efectivas) y 1,27 veces más diverso que el sitio Vialidad (${}^1D=9,855$ especies efectivas) (Tabla 3). Dicho de otra forma, en los sitios urbanos hay

una reducción del 2% y 21,6% respectivamente de la diversidad respecto al sitio/ambiente semiurbano.

Índices	Sitios de muestreo		
	V	R	MA
S	31	47	58
Ab	2383	6512	7102
H'	2,288	2,51	2,531
1D	9,855	12,30	12,566

Tabla 3: Riqueza específica (S), abundancia de individuos (Ab), Índice de Shannon-Wiener (H') y de diversidad de Jost (1D) en los sitios Vialidad (V), Regimiento (R) y Monte Alto (MA).

La comparación de la riqueza de especies con el método de rarefacción (debido a diferencia en el esfuerzo de muestreo entre los sitios) utilizando la muestra más pequeña calculada para un número de 2371 individuos, dio como resultado que la mayor riqueza de especies fue en el sitio Monte Alto ($S= 48,42$), respecto a los sitios Vialidad ($S=30,98$) y Regimiento ($S=41,33$). Es decir que la diversidad calculada a este nivel de intrapolación continúa siendo mayor en el sitio Monte Alto, siendo esta diferencia significativa dado que la diversidad observada de la muestra más pequeña no cae dentro del intervalo de confianza de la muestra más grande (Figura 6).

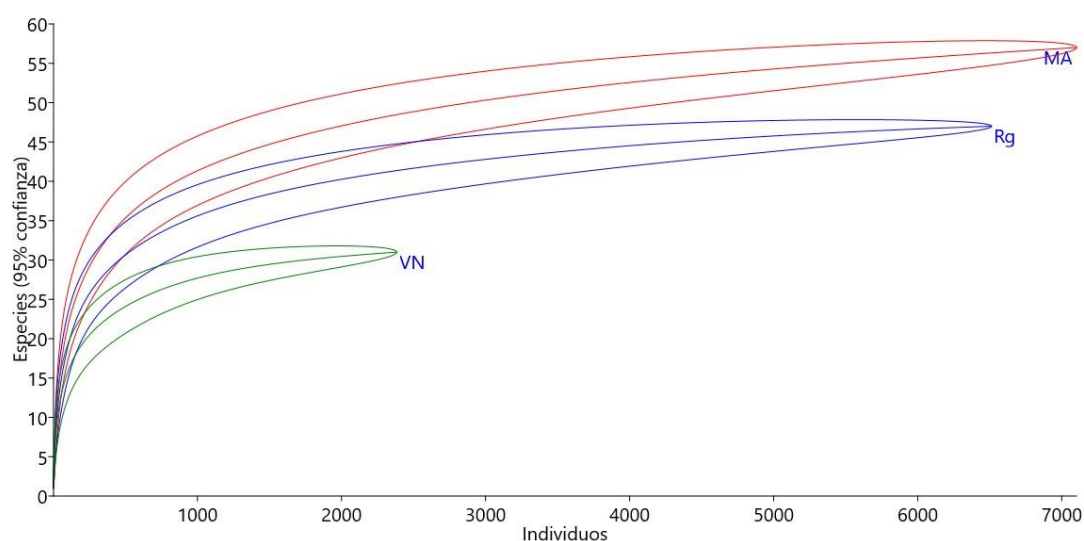


Figura 6: Rarefacción de la abundancia en los ambientes de Vialidad (VN), Regimiento (Rg) y Monte Alto (MA).

Según el estimador de riqueza calculado por sitio, en Vialidad se encontró una representatividad más elevada, calculándose una completitud del 96% (ACE= 32,4 especies estimadas) mientras que la completitud fue menor en Regimiento (ACE=49,74 especies estimadas) y Monte Alto (ACE=63,88), logrando capturar el 94,49 y 90,79% del inventario estimado respectivamente (Tabla 4, Figura 7). Esto indica según el estimador, que en Monte Alto es donde cabría esperar que se adicione nuevas especies al inventario.

Sitios	Índices		
	S	ACE	%
V	31	32,4	96
R	47	49,74	94,49
MA	58	63,88	90,79

Tabla 4: Estimador de riqueza no paramétrico ACE para los sitios de Vialidad (V), Regimiento (R) y Monte Alto (MA). S: Riqueza específica. %: porcentaje de representatividad del muestreo.

En este sentido, tanto en Vialidad como en Regimiento, las curvas de los *Singletons* y *Doubletons* muestran una tendencia a contactarse, indicando que es poco probable que aumente el número de estas especies, mientras que cabría esperar que aumenten las abundancias de las especies raras. Por otra parte, las curvas de los *Singletons* y *Doubletons* en Monte Alto no presentan esta tendencia, indicando que es probable adicionar al inventario nuevas especies raras si se continúan con los muestreos (Figura 7).

Respecto a la estructura de las comunidades y el patrón de distribución de las abundancias de las especies entre los sitios, presentó diferencias en el orden y dominancia de algunas especies. En Vialidad y Regimiento la posición jerárquica más alta fue ocupada por *Ma. titillans* y *Ae. scapularis* como especies eudominantes, seguidas de *Cx. bidens* Dyar para ambos sitios y *Cx. quinquefasciatus* en Vialidad y *Cx. maxi* en Regimiento como dominantes. (Figura 8). En Monte Alto la especie *Ae. scapularis* fue la única especie eudominante de la comunidad, seguida por *Ma. titillans* como especie dominante.

Respecto a las especies raras, se presentaron algunas diferencias. En Monte Alto *An. albitarsis* Lynch Arribalzaga, *An. argyritarsis* Robineau-Desvoidy, *An. neomaculipalpus* Curry, *Cx. pilosus* (Dyar & Knab), *Cx. quinquefasciatus*, *Ur. Lowii* Theobald, *Ps. dimidiata* Cerqueira, *Cq. shannoni* (Lane & Antunes), ocupan la posición al final de la pendiente, las últimas dos especies nombradas ocupan la misma posición en Vialidad junto con *Cq. albicosta* (Peryassú), en Regimiento

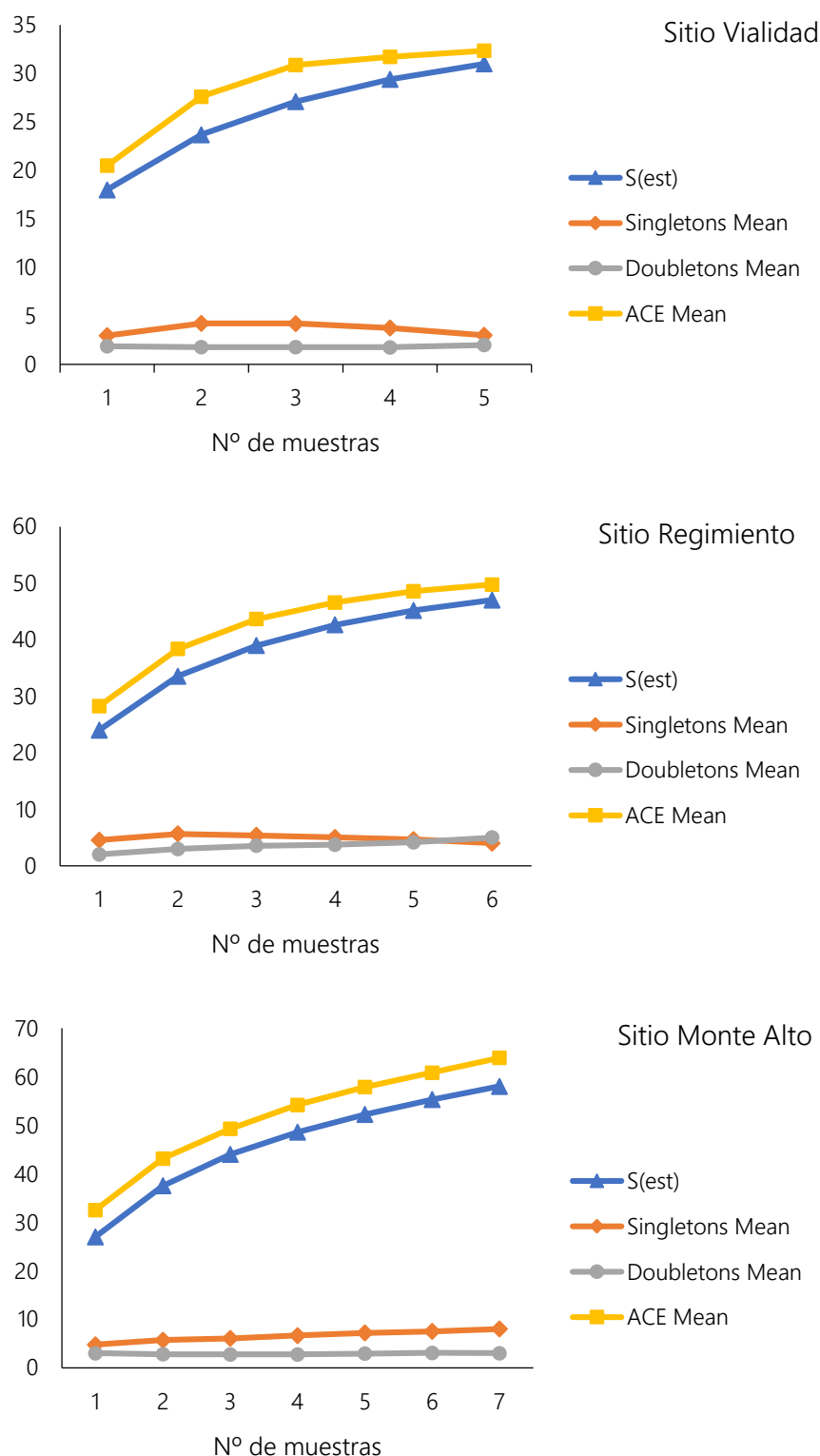


Figura 7: Curva de acumulación de especies de "mosquitos" basado en el estimador de riqueza no paramétrico ACE. S Mean: promedio de la riqueza de especies. *Singletons Mean*: número de especies que están representadas solamente por un único individuo en la muestra y *Doubletons Mean*: número de especies representadas por exactamente dos individuos en la muestra.

An. deaneorum Rosa-freitas, *Cx. bastagarius* Dyar & Knab y *Ma. flaveola* (Coquillett) son las consideradas raras (Figura 8).

Es de notar que en el ambiente urbano *Ae. aegypti* se halló casi con exclusividad en el sitio Vialidad y si bien *Cx. quinquefasciatus* también se halló en Regimiento y Monte Alto, fue significativamente más abundante en Vialidad (Tabla 2 en anexo).

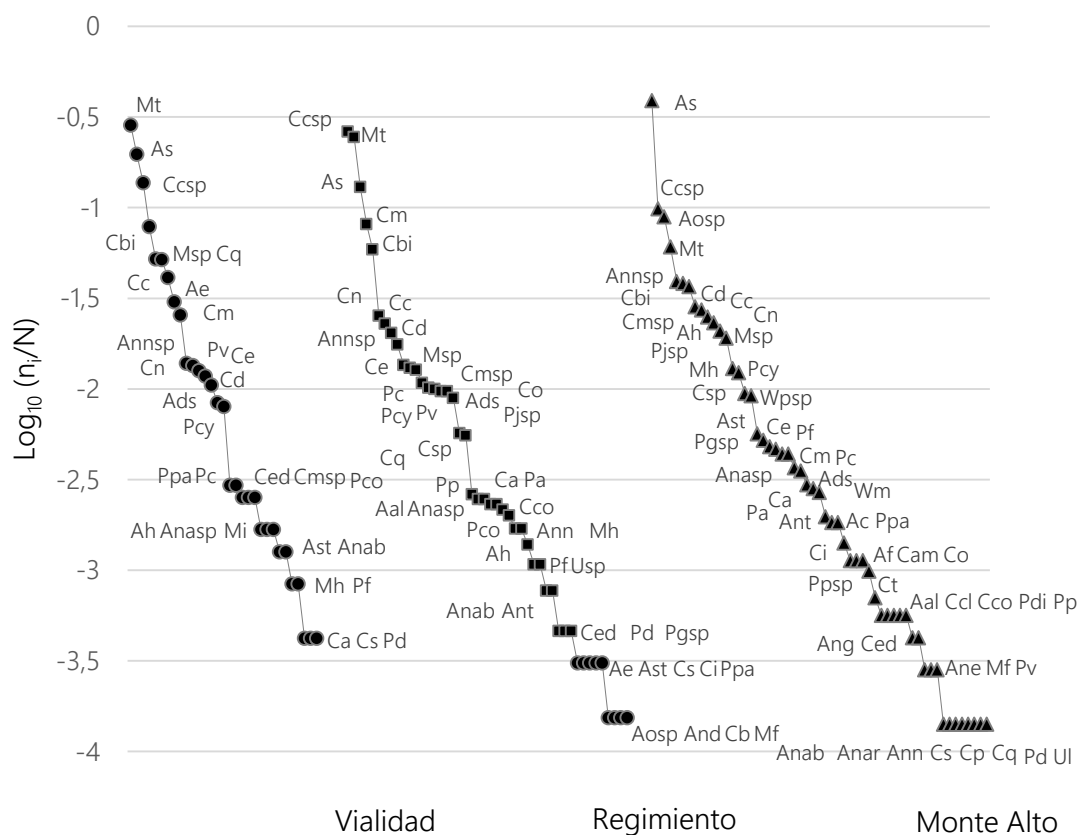


Figura 8: Curvas de abundancia para las especies capturadas en tres ambientes de la ciudad de Resistencia, Chaco. Código de las especies y morfoespecies: Ads *Aedeomyia squamipennis*, Ae *Aedes aegypti*, Aosp *Aedes (Och.)* spp., Aal *Aedes albifasciatus*, Ac *Aedes crinifer*, Af *Aedes fulvus*, Ah *Aedes hastatus*, As *Aedes scapularis*, Ast *Aedes stigmaticus*, Anasp *Anopheles (Ano.)* spp., Annsp *Anopheles (Nys.)* spp., Anab *Anopheles albicans*, Anar *Anopheles argyritarsis*, And *Anopheles deaneorum*, Ane *Anopheles evansae*, Ang *Anopheles galvaoi*, Ann *Anopheles neomaculipalpus*, Ant *Anopheles triannulatus*, Ca *Coquillettia albicosta*, Cn *Coquillettia nigricans*, Cs *Coquillettia shannoni*, Csp *Coquillettia* spp., Ccsp *Culex (Cux.)* spp., Cmsp *Culex (Mel.)* spp., Cam *Culex ameliae*, Cb *Culex bastagarius*, Cbi *Culex bidens*, Cc *Culex chidesteri*, Ccl *Culex clarki*, Cco *Culex coronator*, Cd *Culex delpontei*, Ce *Culex eduardoi*.

Figura 8 (Cont.): Ced *Culex educator*, Ci *Culex intricatus*, Cm *Culex maxi*, Co *Culex ocosa*, Cp *Culex pilosus*, Cq *Culex quinquefasciatus*, Cusp *Culex* spp., Ct *Culex taeniopus*, Mf *Mansonia flaveola*, Mh *Mansonia humeralis*, Mi *Mansonia indubitans*, Msp *Mansonia* spp., Mt *Mansonia titillans*, Pgps *Psorophora (Gra.)* spp., Pjsp *Psorophora (Jan.)* spp., Ppsp *Psorophora (Pso.)* spp., Pa *Psorophora albigena*, Pc *Psorophora ciliata*, Pco *Psorophora confinnis*, Pcy *Psorophora cyanescens*, Pd *Psorophora dimidiata*, Pdi *Psorophora discrucians*, Pf *Psorophora ferox*, Pp *Psorophora pallescens*, Ppa *Psorophora paulli*, Psp *Psorophora* spp., Pv *Psorophora varinervis*, Ul *Uranotaenia lowii*, Wpsp *Wyeomyia (Pho.)* spp., Wm *Wyeomyia muehlensi*.

A pesar de la marcada dominancia de *Ae. scapularis* en Monte Alto, esta comunidad presenta una pendiente más uniforme, indicando que es una comunidad más diversa (Figura 8).

De acuerdo con el análisis de complementariedad, existió un 54% ($C_{AB} = 0,54$) de especies complementarias entre los sitios Monte Alto y Vialidad, indicando un número relativamente bajo de especies compartidas (23 especies compartidas). Mientras que los sitios más similares fueron Monte Alto y Regimiento. Así mismo, Monte Alto fue el sitio que mayor número de especies exclusivas registró (Tabla 4).

	V	R	MA
V	1	0,4	0,54
R	25	2	0,35
MA	23	34	12

Tabla 5: En el triángulo superior a la diagonal se representa el valor del índice de complementariedad. La diagonal representa el número de especies exclusivas de cada ambiente. El triángulo inferior a la diagonal indica el número de especies compartidas entre sitios. Vialidad (V), Regimiento (R) y Monte Alto (MA).

Nuevamente el dendrograma obtenido con el método UPGMA, muestra que los sitios Regimiento y Monte Alto son los más similares conformando un nodo en un alto porcentaje de similitud (Figura 9).

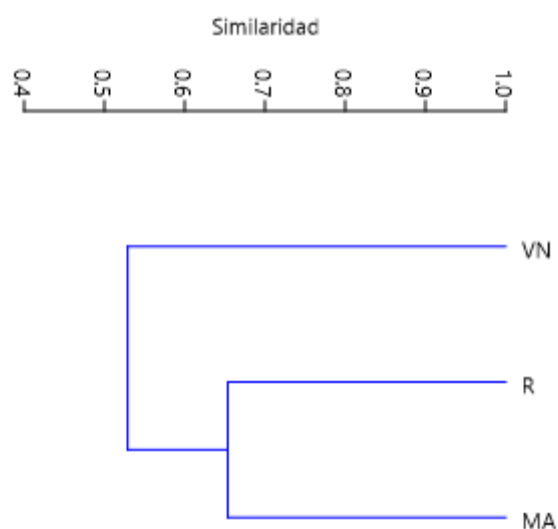


Figura 9: análisis de cluster utilizando el índice de Jaccard, con el método del ligamiento no ponderado (UPGMA). Vialidad (V), Regimiento (R) y Monte Alto (MA).

PATRONES DE ACTIVIDAD TEMPORAL DE CULÍCIDOS Y VARIABLES CLIMÁTICAS

La abundancia total de mosquitos durante los dos períodos analizados fue de 14.934 individuos y 61 especies. En relación a las variables climáticas, durante el primer período, ocurrieron dos picos máximos de precipitación mayores a 260 mm cúbicos, no ocurrido durante el segundo período (Figura 10). Los mayores valores de temperatura máxima en el primer período ocurrieron durante los meses de diciembre a febrero, mientras que en el segundo período entre octubre y enero. La temperatura mínima fue muy similar entre períodos (Figura 10). El análisis de la varianza dio como resultado que no existieron diferencias estadísticamente significativas entre las variables climáticas de los dos períodos de estudio.

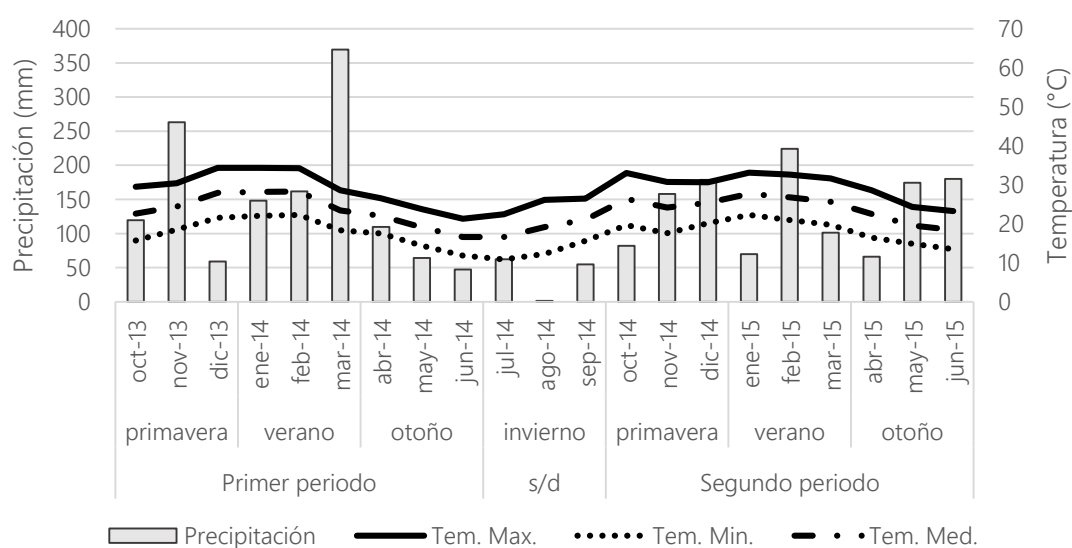


Figura 10: Variación mensual de la precipitación acumulada, la temperatura media, máxima y mínima desde octubre 2013 hasta junio 2015, en el área de estudio.

Si bien las abundancias generales de culícidos fueron similares en ambos períodos, la primavera del primer período y el verano del segundo período fueron las estaciones climáticas con mayor abundancia de mosquitos (3091 y 3277 respectivamente), capturándose el 59,01% del total de especies en las tres

estaciones climáticas (primavera-verano-otoño). Entre ellas, *Ae. scapularis*, *Cx. bidens* y *Ma. titillans*, se presentaron con una abundancia mayor al 5%.

La mayoría de las especies estuvieron presentes en ambos períodos, a excepción de *Ae. albifasciatus*, *Cx. bastagarius*, *Cx. clarki* Evans, *Cx. pilosus*, *Ma. indubitans* y *Ur. lowii* colectadas únicamente durante el primer período, y *An. deaneorum*, *An. evansae* (Brethes), *An. neomaculipalpus*, *Cx. ameliae* Casal, *Cx. coronator* Dyar & Knab, *Cx. taeniopus* Dyar & Knab, *Psorophora (Pso.) spp.*, *Uranotaenia spp.*, *Wy. muehlensi* Petrocchi presentes en el segundo período (Tabla 5 en anexo). En la Figura 11 se representan la distribución estacional de las especies con abundancias mayores al 1% y otras de interés para el presente estudio, durante todo el período analizado.

Las especies del género *Aedes* fueron más abundantes en verano (34,68%) y en el primer período respecto al segundo período (75% de la abundancia total) (Figura 11, A). *Aedes scapularis* y *Ae. hastatus/oligopistus* Dyar fueron las únicas especies del género presentes en todas las estaciones climáticas de los dos períodos, registrando mayores abundancias durante el primero. *Aedes scapularis* fue más abundante en el verano y *Ae. hastatus/oligopistus* en el otoño. *Aedes fulvus* (Wiedeman) estuvo presente únicamente durante el otoño, con mayor abundancia durante el segundo período. *Aedes albifasciatus* fue registrado únicamente en verano y otoño del primer período (Figura 11, A).

Caracterización de la comunidad de culícidos y su variación espacio-temporal en diferentes ambientes de la ciudad de Resistencia, Chaco

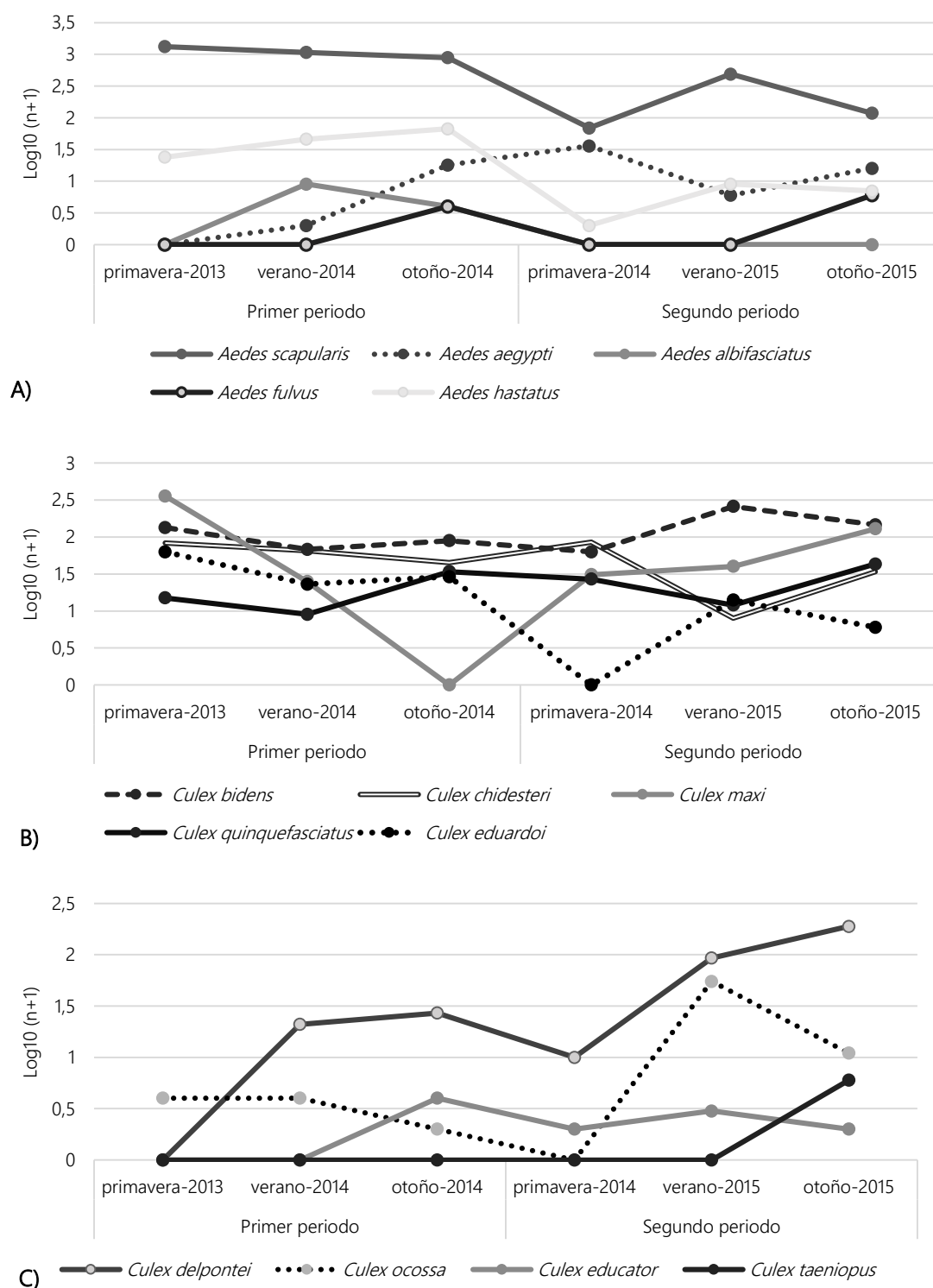


Figura 11: Abundancia de mosquitos expresadas en $\text{Log}_{10} (n+1)$ presentes en las diferentes estaciones climáticas de los dos periodos analizados. A) especies del género *Aedes*. B) especies del género *Culex* subgénero *Culex*. C) especies del género *Culex* subgénero *Melanoconion*

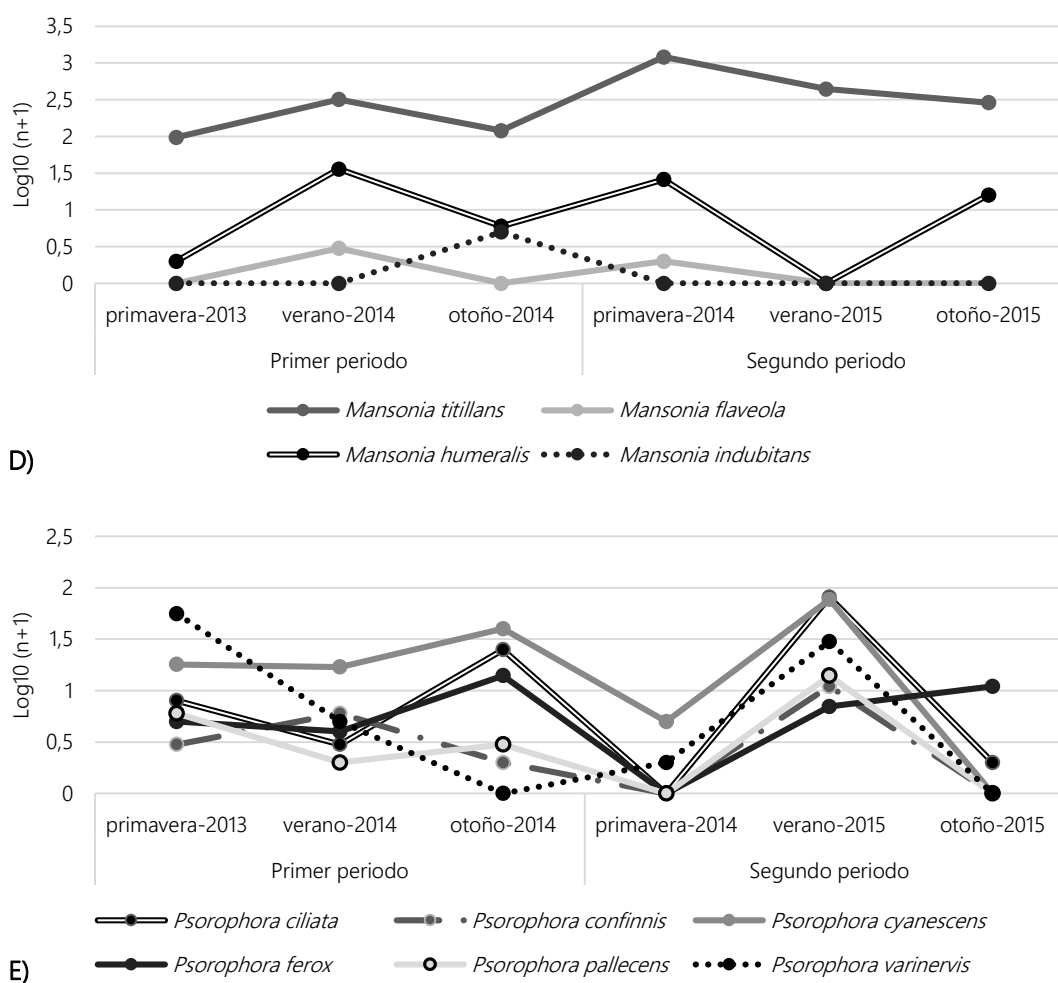


Figura 11 (Cont.): Abundancia de mosquitos expresadas en Log10 (n+1) presentes en las diferentes estaciones climáticas de los dos periodos analizados. D) especies del género *Mansonia*. E) especies del género *Psorophora*.

Si bien la metodología no es la más adecuada para describir la actividad temporal de *Ae. aegypti*, la especie fue registrada en los dos períodos, presentando un pico de abundancia en la primavera del segundo (Figura 11, A).

El género *Coquillettidia* registró las mayores abundancias durante el verano, particularmente del segundo período. *Coquillettidia nigricans* fue la única especie presente en todas las estaciones de los dos períodos.

Mosquitos del género *Mansonia* superaron el 50% de la abundancia total en la primavera del segundo período. *Mansonia titillans* fue registrada en todas las

estaciones climáticas de los dos períodos, con mayores abundancias en la primavera y verano (Figura 11, D).

La mayoría de las especies del género *Psorophora* fueron más abundantes en el segundo período y en las estaciones climáticas primavera y verano. Las especies *Ps. albigena*, *Ps. ciliata*, *Ps. confinnis*, *Ps. cyanescens* y *Ps. pallescens* registraron las mayores abundancias durante el verano del segundo período. *Psorophora paulli* fue registrada únicamente durante el verano de ambos períodos presentando la mayor abundancia en el primer período. *Psorophora varinervis* fue registrada durante la primavera y verano en ambos períodos, con un pico de abundancia durante la primavera del primer período (Figura 11, E) y fue la única especie del género que correlacionó de manera positiva y estadísticamente significativa con la precipitación ($R= 0,81$; $p=0,049$). El resto de las especies analizadas en este trabajo no correlacionaron de manera estadísticamente significativa con las variables climáticas.

Las especies del género *Culex* superaron el 35% del total de los Culicidae capturados, en las estaciones climáticas de primavera y otoño, y las mayores abundancias se concentran en el segundo período de estudio. La mayoría de las especies de este género estuvieron presentes en todas las estaciones de los 2 períodos analizados. Solamente, dos especies del subgénero *Culex*, *Cx. ameliae* y *Cx. coronator*, y cuatro especies del subgénero *Melanoconion*, *Cx. bastagarius*, *Cx. clarki*, *Cx. pilosus* y *Cx. taeniopus* estuvieron presentes en una única o en dos estaciones climáticas. El subgénero *Culex* representó el 75% de la abundancia total

del género. El subgénero *Melanoconion* fue más abundante durante el verano de ambos períodos (Tabla 6 en anexo).

Culex quinquefasciatus y *Cx. educator* fueron las únicas especies del género que correlacionaron de manera estadísticamente significativa con variables climáticas, la humedad relativa tuvo un efecto positivo sobre las abundancias de *Cx. educator* ($R=0,85$; $p=0,03$) y registró la mayor abundancia en el segundo período (Figura 11, C). La precipitación correlacionó de manera negativa sobre las abundancias de *Cx. quinquefasciatus* ($R=-0,89$; $p=0,05$). La última especie se capturó en todas las estaciones climáticas de los dos períodos, con mayor abundancia durante el segundo, y registró picos durante el otoño en ambos períodos estudiados y uno menor en la primavera del segundo. Además, estuvo presente con abundancias similares en Vialidad a lo largo del muestreo y con mayores fluctuaciones en sus abundancias en RG, no detectándose en verano de 2015 (Figura 11, B y Figura 12; Tablas 2 y 5 en anexo).

Al igual que *Cx. quinquefasciatus*, *Cx. chidesteri* y *Cx. bidens* fueron capturadas en todas las estaciones y en los dos períodos, aunque con mayores abundancias durante la primavera y verano respectivamente (Figura 11, B). *Culex chidesteri* presenta la misma tendencia, con la diferencia que la disminución de la abundancia en el ambiente semiurbano fue más abrupta que en el ambiente urbano, además se comportó de manera similar a *Cx. quinquefasciatus* en Vialidad y Regimiento (Figura 12).

Caracterización de la comunidad de culícidos y su variación espacio-temporal en diferentes ambientes de la ciudad de Resistencia, Chaco

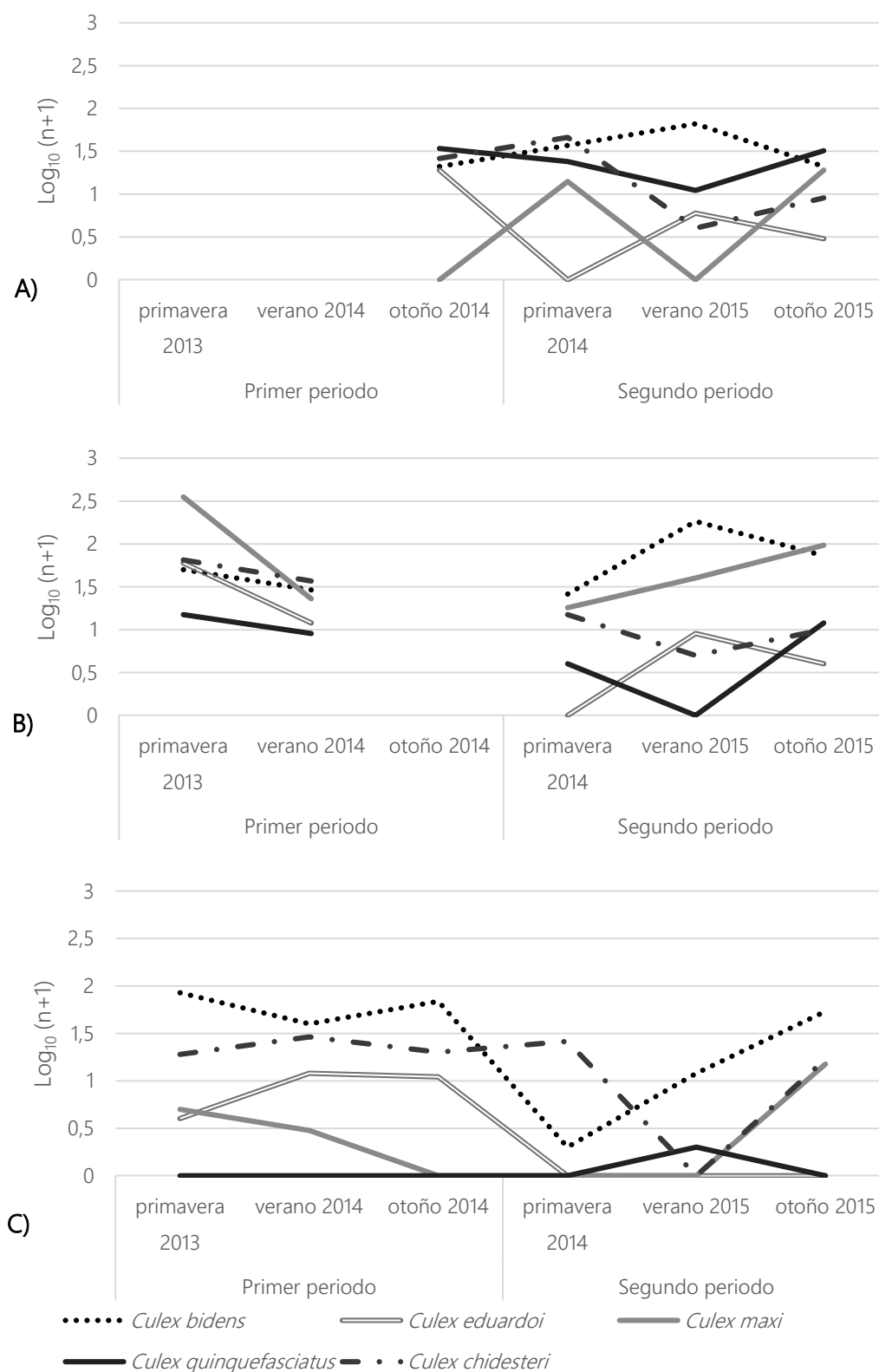


Figura 12: Abundancia de especies (expresadas en Log₁₀) del género *Culex* subgénero *Culex* por estación climática en los diferentes sitios de muestreo: A) Vialidad, B) Regimiento y C) Monte Alto.

Culex bidens tuvo un comportamiento similar en los tres sitios de estudio, presentando picos de abundancia durante el verano del segundo período en los ambientes urbanos. En la primavera del segundo período se capturaron proporcionalmente menos ejemplares en MA (Figura 12).

Culex maxi fue decreciendo en abundancia entre la primavera y el otoño del primer período tanto en Monte Alto como en Regimiento, y en Vialidad se capturó en primavera y otoño del segundo período, pero no en verano (Figura 11, B; Figura 12). *Culex eduardoi* registró un pico de abundancia en la primavera del primer período, mostrando poca fluctuación en sus abundancias en Monte alto. No se registraron individuos en la primavera del segundo período, y la mayor abundancia fue registrada en verano en los ambientes urbanos, siendo notorio el comportamiento similar en estos sitios y prácticamente ausente en Monte Alto (ambiente semiurbano) para el mismo período (Figura 11, B; Figura 12).

Culex maxi, *Cx. eduardoi*, y *Cx. chidesteri* fueron las únicas especies del género que registraron mayor abundancia durante en el primer período (Figura 11, B y Figura 12).

La riqueza de especies de mosquitos citadas para la provincia de Chaco es de 99 pertenecientes a 14 géneros (Rossi, 2015; Stein et al., 2018), y para la ciudad de Resistencia 84 especies en 11 géneros (Stein et al., 2018, 2016). Durante el período de estudio pudimos registrar 72,61% (61/84) de las especies citadas para la ciudad y 9 géneros. El género mejor representado en relación a la abundancia total de individuos fue *Culex*, presentando además la mayor riqueza específica. Estos datos coinciden con los aportados para la provincia de Córdoba, (Gleiser et al., 2010; Batallán et al., 2015; Almirón et al., 1995) y para la provincia de Chaco (Stein et al., 2016). Sin embargo, difieren de los datos aportados por Hack et al., (1978), en una localidad de la provincia de Corrientes, en el cual el género *Mansonia* fue el mejor representado debido a la metodología de muestreo, ya que los autores utilizaron cebo humano principalmente y trampa Shannon.

La mayor diversidad de especies de mosquitos se presentó en Monte Alto (semiurbano) donde las características de la vegetación y la cantidad de cuerpos de agua permanentes y semipermanentes, naturales y artificiales proporcionan mayor heterogeneidad y diversidad de hábitats que favorecen al desarrollo de estados inmaduros de distintas especies de mosquitos (Stein et al., 2016; Gleiser et al., 2010; Batallán et al., 2015). En este sentido el ambiente semiurbano puede jugar un rol importante en el mantenimiento de redes enzoóticas de mantenimiento para diversos arbovirus desde donde se podrían introducir y transmitir varios arbovirus

a humanos y animales hacia el hábitat antrópico (Forattini et al., 1991; Natal et al., 1992).

Regimiento compartió ciertos parámetros en la estructura de la comunidad en cuanto a la abundancia y riqueza de especies con Monte Alto. Estos resultados podrían explicarse porque éste sitio, si bien se encuentra dentro de una zona con alta urbanización, presenta un extenso parche de vegetación en su límite sur, sumado a las condiciones del terreno, exhibiendo un alto grado de heterogeneidad ambiental resultante de la perturbación antrópica que ofrecería también diferentes posibilidades de hábitats larvales (Ronderos et al., 1992; Ribeiro et al., 2012; Consoli et al., 1994), resultando una diversidad intermedia entre los sitios del presente estudio, pero mayor comparando ambos sitios del ambiente urbano. El ambiente urbano mostró una completitud extremadamente alta, lo que sugiere que es poco probable que el número de especies pueda aumentar, incluso si los esfuerzos de muestreo se incrementaran. Stein et al., (2016) obtienen una riqueza específica igual a 46 especies de Culicidae, en un sitio de la ciudad de Resistencia próximo al centro geográfico de la misma. Las diferencias halladas en riqueza en los diferentes sitios de la ciudad, a partir del presente estudio y por lo reportado por Stein et al., (2016) indicarían un ambiente urbano muy heterogéneo con presencia de sitios con características particulares cada uno de ellos que se reflejan en las comunidades de mosquitos y que no pueden ser analizados como un todo igual. Estas diferencias también podrían expresarse en la presencia y actividad de los posibles MBV presentes y su dinámica estacional como encuentran Quaglia (2017) en diferentes

sitios de la ciudad de Córdoba y Oria (2018) en Pampa del Indio, provincia de Chaco. En el ambiente semiurbano la completitud no fue tan elevada, por lo que se esperaría encontrar especies nuevas si el esfuerzo de muestreo se incrementa, datos que concuerdan con lo encontrado por Stein et al., (2016), en el cual encuentran en el mismo ambiente (Monte Alto) una riqueza mucho mayor ($S=74,5$). Si bien el esfuerzo de muestreo entre ambos estudios realizados en el mismo sitio fue diferente, dado que Stein et al., (2016) utilizó una trampa CDC, aunque sus muestreos fueron mensuales, no estacionales, es necesario que tengamos en consideración el proceso de urbanización que este ambiente viene sufriendo desde hace más de una década por lo que la menor riqueza hallada en el presente estudio en este ambiente podría reflejar en parte ese proceso. De allí que consideramos de importancia prestar particular atención al mismo en relación a las especies halladas y no halladas en el presente estudio, que podrían indicar su mayor o menor grado de sensibilidad a la acción del hombre sobre el ambiente y considerarse como indicadores de un ambiente poco o nada perturbado. Asimismo, como se mencionó anteriormente estos ambientes pueden actuar en el mantenimiento de ciclos enzoóticos de arbovirus.

Las especies de los géneros *Aedes* (*Ochlerotatus*) y *Psorophora* presentan índices de sinantropía bajos, siendo predominantes en ambientes caracterizados por una baja o nula perturbación antrópica (Stein et al., 2016; Hack et al., 1978; Ronderos et al., 1992). Entre ellas *Ae. hastatus/oligopistus* mas predominante en Monte Alto en relación al ambiente urbano, y coincidente con lo hallado por (Stein,

2009) en individuos colectados desde el 2001 hasta 2003 en el mismo ambiente semiurbano (Monte Alto), además la especie presentó un pico de abundancia en otoño del año 2003 (Stein, 2009), y en el presente trabajo la especie registra un pico de abundancia en la misma estación climática del primer período (año 2014). Estas especies se reproducen principalmente en charcos naturales temporarios (Stein et al., 2011), los huevos eclosionan cuando sus hábitats están inundados (Forattini, 2002), hábitats característicos de ambientes menos modificados. Coincidiendo con los datos aportados por los autores, en el presente trabajo la abundancia y riqueza en el número de especies de los géneros nombrados presenta un gradiente que disminuye desde el ambiente semiurbano al ambiente urbano con mayor alteración antrópica como Vialidad.

Las mayores abundancias de las especies de los géneros *Aedes* y *Psorophora* se observaron durante la estación lluviosa y cálida (noviembre-abril), datos que coinciden con los aportados por Stein et al., (2016). *Aedes scapularis* cría en ambientes naturales ligeramente alteradores, y también puede encontrarse en ambientes muy perturbados (Stein et al., 2011, 2016; Gleiser et al., 2010; Lourenço-de-Oliveira et al., 1985; Natal et al., 1992; Forattini et al., 1987; Forattini et al., 1997). En el presente trabajo, la especie fue registrada en los tres ambientes, con mayor abundancia en el ambiente semiurbano. Stein et al. (2008, 2016) encuentra a ésta especie como la más abundante y ampliamente distribuida en el mismo ambiente respecto a los otros ambientes (silvestre y urbano). Además, la especie fue

registrada durante todas las estaciones desde 2001 hasta 2003 (Stein et al., 2016), datos que coinciden con los resultados del presente trabajo.

Aedes albifasciatus presenta una mayor abundancia en regiones subtropicales durante el invierno (Stein et al., 2013; 2016) y en regiones templadas, durante el verano (Ludueña Almeida et al., 1995b; Almirón et al., 2000; Fontanarrosa et al., 2000; Gleiser et al., 2002, 1997), en el presente trabajo la abundancia fue muy baja, registrada únicamente en el primer período estudiado, durante las estaciones de verano y otoño. Las bajas abundancias halladas en el presente estudio coinciden con lo expresado por Stein et al., (2011, 2016) que señalan que las mayores abundancias de la especie en la región subtropical corresponden al período invernal, no muestreado en el presente estudio.

Algunas especies de estos dos últimos géneros, como *Ae. albifasciatus*, *Ae. scapularis*, *Ae. aegypti*, *Ae. hastatus*, *Ps. pallescens*, *Ps. ferox* y *Ps. varinervis* se encontraron naturalmente infectadas y/o están implicadas en la transmisión de numerosos virus transmitidos por mosquitos (MBV), entre los que se destacan los virus de los géneros *Alphavirus* (Familia *Togaviridae*), *Orthobunyavirus* (Familia *Bunyaviridae*) y *Flavivirus* (Familia *Flaviviridae*) y virus específicos de insectos (ISF) (Contigiani et al., 2016; Oria et al., 2018).

Algunos autores sugieren que la interferencia humana en el entorno natural puede llevar a la eliminación, modificación y/o sustitución de hábitats, con la consiguiente pérdida de riqueza en la fauna de culícidos existentes, aunque las condiciones también son favorables para el asentamiento de especies exóticas u

oportunistas bien adaptadas a los ambientes perturbados (Consoli et al., 1994; Forattini, 2002). Esto último se observó en Vialidad el sitio con mayor perturbación antrópica que registró la mayor abundancia de *Ae. aegypti*, coincidente con Stein et al., (2011, 2016) registrando a la especie únicamente en el ambiente urbano de la ciudad de Resistencia.

La presencia de *Cx. quinquefasciatus* fue registrada en este trabajo casi exclusivamente en los ambientes urbanos, consistente con otros hallazgos (Campos et al., 1993; Almirón et al., 1995; Gleiser et al., 2010). Además, Stein et al. (2011) detectan la presencia de larvas de *Cx. quinquefasciatus*, principalmente en hábitats artificiales, zanjas con agua turbia y en aguas residuales, en la ciudad de Resistencia, mostrando la alta adaptación de esta especie a los ambientes perturbados. A diferencia de los resultados obtenidos en el trabajo de Stein et al. (2016) sobre adultos de *Cx. quinquefasciatus*, los cuales presentaron mayores abundancias en primavera, la mayor abundancia de los adultos de *Cx. quinquefasciatus* registrada en este trabajo fue durante el otoño. La precipitación tuvo un efecto negativo y estadísticamente significativo sobre la abundancia de la especie, coincidente con lo hallado por Stein et al. (2016) en la misma ciudad, lo cual podría ser explicado por un efecto de lavado en los hábitats larvales dónde se halla producto de la abundante precipitación (Stein et al., 2011) o también podría ser explicado por una baja heterogeneidad de días de precipitación (Valdez et al., 2017).

Los cambios u oscilaciones en las abundancias y estacionalidad de las especies, en un período de tiempo determinado, pueden ser explicados por factores

propios de las regiones climáticas. Por lo que las diferencias halladas en este estudio en relación con lo hallado por Stein et al. (2016) para la misma especie reafirman la necesidad y la importancia de conocer la influencia de los factores ambientales (climáticos) sobre las poblaciones de insectos ya que los mismos pueden variar de año a año para las mismas estaciones climáticas. El hallazgo de *Cx. quinquefasciatus* en el presente trabajo es de gran importancia, debido a que ha sido implicado como principal vector de SLEV (Diaz et al., 2013) en el brote ocurrido en la provincia de Córdoba en el año 2005 (Diaz et al., 2003; Spinsanti et al., 2008). En esta especie además se detectaron otros arbovirus (*Bunyaviridae: Orthobunyavirus*) en Argentina (Tauro et al., 2015).

Culex chidesteri fue más abundante en el ambiente semiurbano disminuyendo en los ambientes urbanos, y *Cx. bidens* presentó la mayor abundancia en el sitio Regimiento seguido por el sitio Monte Alto (semiurbano) y por ultimo Vialidad (urbano), estos datos coinciden con lo hallado por Stein et al. (2016) en el que identificaron que ambas especies pueden estar relacionadas con áreas urbanas (eusinantrópicas), aunque en nuestra región, son más abundantes en ambientes menos perturbados. En otros trabajos, *Cx. bidens* y *Cx. maxi* muestran picos recurrentes de abundancia sin desaparecer completamente (Almirón et al., 1995; Maciá et al., 1995; Stein et al., 2016; Fischer et al., 2004), coincidiendo mayormente con el patrón observado en el presente trabajo. *Culex bidens* es una especie que se ubica dentro del complejo *bidens* al cual pertenece la especie *Cx. interfor* Dyar. Ambas especies sólo se diferencian por ciertas características de la

genitalia del macho y por estudios moleculares lo que hace muy difícil diferenciarlas como hembras adultas (Laurito et al., 2017). Ambas especies presentan la misma distribución en Argentina (Rossi, 2015) dato que debería tenerse en cuenta ya que de la última se detectó el SLEV durante la epidemia de Saint Louis en la ciudad de Córdoba en el 2005 (Díaz et al., 2006; Díaz, 2009) y recientes trabajos han corroborado su competencia vectorial en la transmisión del mismo virus (Beranek et al., 2018).

También es de destacar que otras especies como *Cx. ocosa*, *Mansonia* spp., *An. albitarsis* y *Cx. delponte*i halladas en el presente estudio han sido implicadas en la transmisión de numerosos virus transmitidos por mosquitos (MBV) (Contigiani et al., 2016) además de detectarse la presencia de ISF (Oria et al., 2019).

- Alberto JA. El Chaco oriental y sus fisonomías vegetales. Inst Geogr (IGUNNE) Fac Humanidades UNNE Resist Chaco Argentina 2004:1–9.
- Alberto JA. Vulnerabilidad ecológica: entre lo ambiental y lo social. El caso del área metropolitana del Gran Resistencia. In: Foschiatti MAH, editor. Aportes conceptuales y empíricos la vulnerabilidad Glob., Resistencia, Chaco: EUDENE.; 2007, p. 119–58.
- Alberto JA. Expansión Urbana, Parantrofitia y Parantrozootia... ¿Biocenosis Antropogénicas? El Caso del Área Metropolitana del Gran Resistencia (A.M.G.R.), Chaco. Resistencia, Chaco: 2014.
- Almirón WR, Brewer M. Distribución estacional de Culicidae (Diptera) en áreas periféricas de Córdoba (Argentina). Ecol Austral 1995;5:81–6.
- Almirón WR, Ludueña Almeida F, Brewer F. Relative abundance and gonotrophic status of *Aedes albifasciatus* (Diptera: Culicidae) during the autumn-winter period in Córdoba Province, Argentina. J Med Entomol 2000;32:16–20.
- Balseiro EG. Analisis de la actividad nocturna de *Culex* (Cx.) *eduardoi* Casal y Garcia y *Aedes* (O.) *crinifer* (Humboldt) (Diptera: Culicidae), mediante el empleo de un atractivo luminico. RevSocEntomolArgent 1981;40:211–9.
- Balseiro EG. Análisis de la actividad diaria de Dipteros Nematoceros en Punta Lara (Pdo. de Ensenada, Prov. de Buenos Aires). Rev La Soc Entomológica Argentina 1989;47:157–63.
- Batallán GP, Estallo EL, Flores FS, Sartor P, Contigiani MS, Almirón WR. St. Louis Encephalitis virus mosquito vectors dynamics in three different environments in relation to remotely sensed environmental conditions. Acta Trop 2015;146:53–9. doi:10.1016/j.actatropica.2015.03.009.
- Beranek M, Quaglia AI, Peralta GC, Diaz LA, Stein M, Almirón WR, et al. Competencia vectorial del virus St. Louis encephalitis (Flavivirus: Flaviviridae) en dos poblaciones de *Culex quinquefasciatus* de Córdoba y Resistencia. La Rioja, Argentina: XI Jornadas Regionales sobre Mosquitos; 2018.
- Berón CM, Campos RE, Gleiser RM, Díaz-Nieto LM, Salomón OD, Schweigmann N, editors. Investigaciones sobre mosquitos de Argentina. 1a ed. Mar Del Plata: 2016.
- Bruniard ED. El Gran Chaco Argentino. In: UNNE F de H, editor. Geográfica. Rev. del Inst. Geogr., Resistencia, Chaco: 1978.
- Campos RE, Maciá A, García J. Fluctuaciones estacionales de culícidos (Diptera) y sus enemigos naturales en zonas urbanas de los alrededores de La Plata, provincia de Buenos Aires. Neotrópica 1993;39:55–66.
- Campos RE, Maciá A, GARCIA JJ. Variación estacional de las poblaciones de *Psorophora* spp. (Diptera: Culicidae) y detección de sus parásitos y patógenos en la provincia de Buenos Aires, Argentina. Acta Entomológica Chil 1995;19:113–21.
- Cardoso J da C, Bicudo De PM, Fernandes A, dos Santos E, Barreto De Almeida MA, Fernandes da Fonseca D, et al. Ecological aspects of mosquitoes (Diptera : Culicidae) in an Atlantic forest area on the north coast of Rio Grande do Sul State , Brazil. J Vector Ecol 2011;36:175–86.
- Colwell RK, Coddington JA. Estimating terrestrial biodiversity through extrapolation. Philos Trans R Soc London Ser B Biol Sci 1994;345:101–18. doi:10.1098/rstb.1994.0091.
- Colwell RK. EstimateS: Statistical estimation of species richness and shared species from samples. 2009.
- Consoli R, Lourenço-de-Oliveira R. Principias Mosquitos de Importancia Sanitária no Brasil. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz; 1994.
- Contigiani MS, Díaz LA, Spinsanti LI, Tauro LB. Arbovirus. In: Berón CM, Campos RE, Gleiser RM, Díaz-Nieto LM, Salomon OD, Schweigmann N, editors. Investig. sobre mosquitos Argentina. Primera, Mar Del Plata:

- Universidad Nacional de Mar del Plata; 2016, p. 157–78.
- Darsie RF. Mosquitos of Argentina.Part I.Keys for identification of adult females and fourth stages larvar in english and spanish (Diptera: Culicidae). *Mosq Syst* 1985;17:153–253.
- Diaz LA, Spinsanti LI, Almiron WR, Contigiani MS. BRIEF COMMUNICATION UNA VIRUS : FIRST REPORT OF HUMAN INFECTION IN ARGENTINA 2003;45:109–10.
- Diaz LA, Flores FS, Beranek M, Rivarola ME, Almirón WR, Contigiani MS. Transmission of endemic st louis encephalitis virus strains by local culex quinquefasciatus populations in có rdoba, argentina. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2013;107:332–4. doi:10.1093/trstmh/trt023.
- Fava F, Ludueña-Almeida FF, Almirón WR, Brewer M. Winter Biology of Aedes albifasciatus (Diptera:Culicidae) from Córdoba, Argentina. *J Med Entomol* 2001;38:253–9.
- Fischer S, Schweigmann N. Culex mosquitoes in temporary urban rain pools: seasonal dynamics and relation to environmental variables. *J Vector Ecol* 2004;29:365–73.
- Fontanarrosa MS, Marinone MC, Fischer S, Orellano PW, Schweigmann N. Effects of Flooding and Temperature on Aedes albifasciatus Development Time and Larval Density in Two Rain Pools at Buenos Aires University City. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2000;95:787–93. doi:10.1590/S0074-02762000000600007.
- Forattini OP, de Castro Gomez A, Natal D, Kakitani I. Frequencia domiciliar e endofilia de mosquitos culicidae no vale do riveira, Sao Paulo, Brazil. *Rev Saude Publica* 1987;21:188–92.
- Forattini OP, de Castro Gomez A, Kakitani I, Marucci D. Domiciliation of Culex mosquitoes (Melanoconion), in man-made deeply modified environment. *Rev Saude Publica* 1991;25:257–66.
- Forattini OP, Kakitani I, Mureb Sallum MA. Encontro de criadouros de Aedes scapularis (Diptera: Culicidae) em recipientes artificiais. *Rev Saude Publica* 1997;31:519–22.
- Forattini OP. Culicidologia médica. Editora da Universidade de São Paulo; 2002.
- Foschiatti AM. La Población del Nordeste Argentino. Resistencia, Chaco: Facultad de Humanidades. UNNE; 2003.
- García-Morales R, Moreno CE, Bello-Gutiérrez J. Renovando las medidas para evaluar la diversidad en comunidades ecológicas: el número de especies efectivas de murciélagos en el sureste de Tabasco. *Therya* 2011;48:623–8.
- Gleiser RM, Gorla DE, Ludueña Almeida FF. Monitoring the abundance of Aedes (Ochlerotatus) albifasciatus (Macquart 1838) (Diptera: Culicidae) to the south of Mar Chiquita Lake, central Argentina, with the aid of remote sensing. *Ann Trop Med Parasitol* 1997;91:917–26. doi:10.1080/00034983.1997.11813219.
- Gleiser RM, Schelotto G, Gorla DE. Spatial pattern of abundance of the mosquito, Ochlerotatus albifasciatus, in relation to habitat characteristics. *Med Vet Entomol* 2002;16:364–71. doi:10.1046/j.1365-2915.2002.00384.x.
- Gleiser RM, Zalazar LP. Distribution of mosquitoes in relation to urban landscape characteristics. *Bull Entomol Res* 2010;100:153–8. doi:10.1017/S0007485309006919.
- Gould E, Pettersson J, Higgs S, Charrel R, de Lamballerie X. Emerging arboviruses: Why today? *One Heal* (Amsterdam, Netherlands) 2017;4:1–13. doi:10.1016/j.onehlt.2017.06.001.
- Hack W, Torales M, Bar M, Oscherov B. Observaciones etológicas sobre culicidos de Corrientes. *Rev La Soc Entomológica Argentina* 1978;37:137–51.
- Hammer Ø, Harper D, Ryan P. PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. *Palaeontol Electron* 2001;4:9.
- Hill MO. Diversity and Evenness: A Unifying Notation and Its Consequences. vol. 54. 1973.
- Jost L. Entropy and diversity. *Oikos* 2006;113:363–75. doi:10.1111/j.2006.0030-1299.14714.x.
- Jost L. Partitioning Diversity Into Independent Alpha and Beta Components. *Ecology* 2007;88:2427–39. doi:10.1890/06-1736.1.

Caracterización de la comunidad de culícidos y su variación espacio-temporal en diferentes ambientes de la ciudad de Resistencia, Chaco

- Laurito M, Ayala AM, Almirón WR, Gardenal CN. Molecular identification of two Culex (Culex) species of the neotropical region (Diptera: Culicidae). PLoS One 2017;12:1–12. doi:10.1371/journal.pone.0173052.
- Loetti V, Burrioni N, Vezzani D. Seasonal and daily activity patterns of human-biting mosquitoes in a wetland system in Argentina. J Vector Ecol 2007;32:358–65. doi:10.3376/1081-1710(2007)32[358:SADAPO]2.0.CO;2.
- Lourenço-de-Oliveira R, Fernandes Da Silva T, Heyden R. Alguns aspectos da ecologia dos mosquitos (Diptera: Culicidae) de um área de planície (Granjas Calábria), em Jacarepaguá, Rio de Janeiro. II. Freqüência mensal e no ciclo lunar. Mem Inst Oswaldo Cruz 1985;80:123–33.
- Ludueña Almeida FF, Gorla DE. The biology of Aedes (Ochlerotatus) albifasciatus Macquart, 1838 (Diptera: Culicidae) in central Argentina. Mem Inst Oswaldo Cruz 1995a;90:463–8. doi:10.1590/S0074-02761995000400006.
- Ludueña Almeida FF, Gorla DE. Daily pattern of flight activity of Aedes albifasciatus in central Argentina. Mem Inst Oswaldo Cruz 1995b;90:639–44. doi:10.1590/S0074-02761995000500020.
- Maciá A, García J, Campos RE. Bionomía de Aedes albifasciatus y Ae. crinifer (Diptera: Culicidae) y sus enemigos naturales en Punta Lara, Buenos Aires. Neotrópica 1995;41:43–50.
- Maciá A, García JJ, Campos RE. Variación estacional de tres especies de Culex (Diptera: Culicidae) y sus parásitos y patógenos en Punta Lara, provincia de Buenos Aires, Argentina. Rev Biol Trop 1997;44–45:267–75.
- Moreno CE, Barragán F, Pineda E, Pavón N. Reanalizando la diversidad alfa: alternativas para interpretar y comparar información sobre las comunidades ecológicas. Rev Mex Biodivers 2011;82:1249–61.
- Muscar Benasayag EF, Franchini T. Emplazamiento Urbanos en Zonas de Riesgos naturales: El Caso del Gran Resistencia en la Planicie Chaqueña. Estud. Geográficos. Tomo LIII, Madrid: C.S.I.C. Centro de Investigaciones Sobre la Economía, la Sociedad y el Medio (C.I.E.S.M.); 1992, p. 481–501.
- Natal D, Soares Barata JM, Taipe Lagos CB, Moreira Rocha R. Nota sobre culicídeos (Diptera: Culicidae) da bacia do rio Purus, Acre, Amazônia (Brasil). Rev Saude Publica 1992;26:129–230.
- Naumann M. Atlas del Gran Chaco Sudamericano. 2ª Edición. Buenos Aires: ErreGé & Asoc.; 2006.
- Oria GI. Patrones de Distribución espacio-temporal de Flavivirus (Flaviviridae) en Pampa del Indio, provincia de Chaco. Tesis doctoral. Universidad Nacional del Nordeste, 2019.
- Oria GI, Stechina OS, Diaz LA, Stein M. Flavivirus (Flaviviridae) específicos (ISFs) detectados en mosquitos de Pampa del Indio, Chaco. 2018.
- Quaglia AI. Comunidades de Mosquitos Vectores y Hospedadores Aviares y su Asociación en el Mantenimiento del virus St. Louis Encephalitis (Flavivirus). Tesis doctoral. Universidad Nacional de Córdoba, 2017.
- Reinert J. New classification for the composite genus Aedes (Diptera: Culicidae: Aedini), elevation of subgenus Ochlerotatus to generic rank, reclassification of the other subgenera and notes on certain subgenera and species. J Am Mosq Control Assoc 2000;16:175–88.
- Ribeiro AF, Urbinatti PR, de Castro Duarte AMR, de Paula MB, Pereira DM, Mucci LF, et al. Mosquitoes in degraded and preserved areas of the Atlantic Forest and potential for vector-borne disease risk in the municipality of São Paulo, Brazil. J Vector Ecol 2012;37:316–24. doi:10.1111/j.1948-7134.2012.00233.x.
- Ronderos R, Schnack J, Maciá A. Composición y variación estacional de una taxocenosis de Culicidae del Ecotono Subtropical Pampasico (Insecta, Diptera). Graellsia 1992;48:3–8.
- Rossi GC. Annotated checklist, distribution, and taxonomic bibliography of the mosquitoes (Insecta: Diptera: Culicidae) of Argentina. Check List 2015;11:1–15. doi:10.15560/11.4.1712.
- Da Silva CJ, Insaurralde JA, Cardozo OD. Cartografía de coberturas del suelo mediante sensores remotos, de la ciudad de Resistencia, Argentina (2013). Rev Geográfica Digit IGUNNE Fac Humanidades UNNE 2014:1–18.

- Spinsanti LI, Díaz LA, Glatstein N, Arselán S, Morales MA, Farías AA, et al. Human outbreak of St. Louis encephalitis detected in Argentina, 2005. *J Clin Virol* 2008;42:27–33. doi:10.1016/j.jcv.2007.11.022.
- Stein M, Oria GI, Almirón WR, Willener JA. Fluctuación estacional de *Aedes aegypti* en Chaco, Argentina. *Rev Saúde Pública* 2005;39:559–64.
- Stein M. Bonomía y taxonomía de Culicidae (Diptera) recolectados en el departamento San Fernando, provincia de Chaco. Tesis doctoral. Universidad Nacional del Nordeste, 2009.
- Stein M, Ludueña-Almeida F, Willener JA, Almirón WR. Classification of immature mosquito species according to characteristics of the larval habitat in the subtropical province of Chaco, Argentina. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2011;106:400–7. doi:10.1590/S0074-02762011000400004.
- Stein M, Zalazar L, Willener JA, Almeida FL, Almirón WR, Stein M, et al. Culicidae (Diptera) selection of humans, chickens and rabbits in three different environments in the province of Chaco, Argentina. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2013;108:563–71. doi:10.1590/S0074-02762013000500005.
- Stein M, Santana M, Galindo LM, Etchepare E, Willener JA, Almirón WR. Culicidae (Diptera) community structure, spatial and temporal distribution in three environments of the province of Chaco, Argentina. *Acta Trop* 2016;156:57–67. doi:10.1016/J.ACTATROPICA.2015.12.002.
- Stein M, Alvarez CN, Alonso ANAC, Bangher DN, Willener JA, Campos RE. New records of mosquitoes (Diptera: Culicidae) found in phytotelmata in Northern Argentina 2018;4399:87–100.
- Tauro LB, Batallan GP, Rivarola ME, Visintin A, Berrón CI, Sousa EC, et al. Detection of Orthobunyavirus in mosquitoes collected in Argentina. *Med Vet Entomol* 2015;29:338–43. doi:10.1111/mve.12121.
- Tuomisto H. A consistent terminology for quantifying species diversity? Yes, it does exist. *Oecologia* 2010a;164:853–60.
- Tuomisto H. A diversity of beta diversities: straightening up a concept gone awry. Part 1. Defining beta diversity as a function of alpha and gamma diversity. *Ecography (Cop)* 2010b;33:2–22.
- Valdez LD, Sibona GJ, Diaz LA, Contigiani MS, Condat CA. Effects of rainfall on *Culex* mosquito population dynamics. *J Theor Biol* 2017;421:28–38. doi:10.1016/j.jtbi.2017.03.024.

CAPÍTULO III

Flavivirus presentes en diferentes ambientes de la ciudad de Resistencia y su dinámica espacio-temporal

Actualmente, la disponibilidad de una variedad de métodos para secuenciación permitió la detección y descripción de una gran variedad de ISF (Crabtree et al. 2009; Hoshino et al., 2007; Cook et al., 2009; Z. Wang et al., 2009; Bolling et al., 2011; Junglen et al., 2009; Hobson-Peters et al., 2013; Goenaga et al., 2014); sin embargo, son escasos los trabajos en los que se describe la distribución espacio-temporal de los mismos (Blitvich et al., 2010; Kim et al., 2009; Machado et al., 2012). En argentina, han sido detectados en las provincias Corrientes (Goenaga et al., 2014), Córdoba y Santa Fe (en datos no publicados) y la localidad de Pampa del Indio, Chaco (Oria et al., 2018).

En relación a los MBV, en Argentina, los antecedentes datan desde el año 1900 con algunas epizootias y aislamiento de los mismos, sin embargo, los registros son dudosos y vectores desconocidos (Sabattini et al., 1985). No fue hasta la década del '70, que se inician los primeros estudios para determinar los vectores y hospedadores responsables del mantenimiento enzoótico y la propagación epizootica de los *Flavivirus* y otros arbovirus en Argentina. Desde entonces y hasta la actualidad, han sido detectados en nuestro país los *Flavivirus* (MBV) SLEV, YFV, DENV 1-4, ZIKV, BSQ (Bussuquara virus), ILH (Ilheus virus) y WNV, en humanos, aves silvestres y domésticas, monos, mosquitos y equinos (Diaz et al., 2008, 2012; Oria et al., 2018; Beskow et al., 2007; Monath et al., 1985; Mitchell et al., 1987).

Por tal motivo, y debido a que en los últimos 200 años, las áreas urbanizadas han aumentado 40 veces a nivel global (Hotez 2017; World Health Organization,

2015) y con ello las enfermedades de transmisión vectorial, se hace imprescindible para poder estimar el riesgo en la salud de la población y diseñar estrategias de manejo vectorial, conocer cuáles son los *Flavivirus* que circulan en ambientes que presentan diferente grado de urbanización y cómo éstos responden a las fluctuaciones estacionales de las especies de mosquitos en un entorno dinámico. Estas son algunas de las cuestiones que nos llevaron por un lado a 1) Detectar los *Flavivirus* en mosquitos potencialmente vectores, e 2) describir los patrones espacio-temporal de estos virus y su relación con las fluctuaciones de las especies de mosquitos colectados en ambientes con diferente grado de urbanización en la ciudad de Resistencia.

Detalles sobre la caracterización del área de estudio, características de los sitios, periodicidad de los muestreos, y determinación taxonómica, se encuentran en la sección Materiales y Métodos del Capítulo II.

Para llevar a cabo los objetivos desarrollados en el presente capítulo, se consideraron dos periodos temporales, primer periodo comprende desde la primavera 2013 hasta otoño 2014, y el segundo periodo desde primavera 2014 hasta otoño 2015.

OBTENCIÓN DEL ARN VIRAL, TRANSCRIPCIÓN REVERSA Y DETECCIÓN POR PCR-NESTED

Los pools obtenidos, metodología desarrollada en el capítulo II, fueron homogeneizados en morteros estériles y diluidos en medio esencial mínimo (MEM) suplementado al 10% con suero fetal bovino (SFB), 1% con antibiótico (gentamicina) y 1% con antimicótico (fungizona). Los pools conteniendo entre 1 y 25 mosquitos fueron homogeneizados en 1 ml de MEM suplementado y pools con 25 a 50 mosquitos se homogeneizaron en 2 ml de MEM suplementado. Los homogeneizados fueron centrifugados a 11.400 g durante 30 min en centrífuga refrigerada para su descontaminación. Los sobrenadantes obtenidos se recuperaron y almacenaron en tubos Eppendorf a -70 °C hasta ser utilizados.

Se utilizó 200µL del sobrenadante del homogeneizado para la extracción del ARN viral con Kit AxyPrepBody Fluid Viral RNA (Axygen-BIOSCIENCES) siguiendo las instrucciones del fabricante. Para la síntesis de ADN complementario (ADNc) se

mezclaron 10 µL del ARN extraído de cada muestra, previa incubación por 10 min a 65 °C, con 10 µL de mezcla de reacción (volumen final 20 µL) conteniendo 2mM MgCl₂, 0,2Mm dNTPs, random hexamer primers, RNAsa OUT, 5U Transcriptasa reversa ImPROMII. Las muestras fueron sometidas a un ciclo inicial de 60 minutos a 42 °C luego a 10 minutos a 65 °C. El ADNc obtenido fue almacenado a -20 °C.

Para la detección del genoma de todos los miembros del género *Flavivirus* se realizó una PCR-Nested genérica diseñada por Sánchez-Seco et al., (2005). La muestra que presentó buena calidad de amplificación (banda muy fuerte), el fragmento amplificado (143 pares de bases) fue purificado y secuenciado en ambas direcciones (forward y reverse) por el método sanger (Macrogen, Corea). Las muestras que no pudieron ser secuenciadas por su calidad fueron testeadas con PCR-Nested específica para el SLEV (Ré et al., 2008).

ANÁLISIS DE LAS SECUENCIAS E IDENTIFICACIÓN MOLECULAR.

Una vez obtenidas las secuencias de los fragmentos amplificados, las mismas fueron editadas utilizando el programa MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing plat forms (Kumar et al., 2018) para obtener las secuencias consenso. La identificación del agente detectado se llevó a cabo mediante estudios de homología de secuencias utilizando la herramienta BLAST (Basic Local Alignment Search Tool, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

CÁLCULO DE LA TASA MÍNIMA DE INFECCIÓN

Para cuantificar la actividad de los *Flavivirus* en las poblaciones de mosquitos analizadas se calculó la Tasa Mínima de Infección (TMI), la cual fue calculada de la siguiente manera: número total de pools positivos/total de mosquitos procesados por especie.

ANÁLISIS FILOGENÉTICO

Se realizaron alineamientos múltiples mediante Clustal W de las secuencias obtenidas junto con otras pertenecientes al mismo género, utilizando para ello el programa MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms (Kumar et al., 2018). El estudio filogenético se hizo a nivel de nucleótidos.

La selección del método de inferencia y el algoritmo de distancia se realizó desde el programa MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms (Kumar et al., 2018), y un valor de certidumbre (o "*bootstrap*") como robustez de la topología del árbol) de 1500 réplicas como el test estadístico de validación.

Los mosquitos *Culex (Culex)*spp. y *Aedes (Stegomyia)* spp. procesados para la detección del genoma de *Flavivirus* sumaron un total de 100 *pools*, los cuales estaban conformados por 2162 hembras, de las cuales el 1,3% estaban alimentadas, y 13 machos. Las especies procesadas fueron *Ae. aegypti*, *Cx. ameliae*, *Cx. bidens*, *Cx. chidesteri*, *Cx. coronaror*, *Cx. eduardoi*, *Cx. maxi*, *Cx. quinquefasciatus* y *Cx. (Cux.)* spp., 66 *pools* urbanos y 34 *pools* periurbanos. De los *pools* procesados 79 fueron positivos para *Flavivirus*.

IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE LOS *FLAVIVIRUS* DETECTADOS EN MOSQUITOS.

A partir de los productos de amplificación obtenidos del gen que codifica la proteína NS5 fueron secuenciados 53 *pools* positivos. Todas las secuencias obtenidas en este trabajo, se denominaron por el número de pool y las siglas de secuencia consenso (nºpool cs) dieron una homología mayor al 95% con secuencias depositadas en la base de datos de virus descritos como *Flavivirus* específicos de insectos (ISF). Los *pools* de *Ae. aegypti* positivos dieron una homología de 97% con CFAV. Los pools de mosquitos *Culex (Cux.)* dieron una homología mayor a 97% con secuencias de CXFV depositadas en la base de datos del Genbank.

De un total de 8 pools procesados conteniendo 67 mosquitos *Ae. aegypti*, de los cuales 3 *pools* corresponden a machos y 1 *pool*/a hembra alimentada, (Tabla 1), 3 *pools* de hembras no alimentadas fueron positivos para CFAV.

*Flavivirus presentes en diferentes ambientes de la ciudad de Resistencia
y su dinámica espacio-temporal*

En relación a los mosquitos *Culex (Culex)* spp. procesados, 50 pools fueron positivos para CxFV de un total de 66 pools (1419 individuos), comprendidos en 7 especies del subgénero *Culex* y una morfoespecie (Tabla 1). De los pools positivos, el 8% correspondieron a hembras alimentadas, y no se obtuvieron pools positivos de machos.

Especies	Ambiente	Nº mosquitos	Nº pools	Pools post.	TMI	%de pools post.	Virus
<i>Aedes aegypti</i>	Urbano	67	8	3	0,04	37,5	CFAV
	Semiurbano						
<i>Culex ameliae</i>	Urbano						
	Semiurbano	8	1				
<i>Culex bidens</i>	Urbano	396	15	14	0,03	93,3	CXFV
	Semiurbano	185	6	5	0,02	83,3	CXFV
<i>Culex chidesteri</i>	Urbano	168	7	4	0,02	57,2	CXFV
	Semiurbano	62	3	1	0,01	33,3	CXFV
<i>Culex coronator</i>	Urbano						
	Semiurbano	4	1	1	0,25	100	CXFV
<i>Culex eduardoi</i>	Urbano	34	4	2	0,05	50	CXFV
	Semiurbano	13	3	2	0,15	66,6	CXFV
<i>Culex maxi</i>	Urbano	287	7	7	0,02	100	CXFV
	Semiurbano	6	2	1	0,16	50	CXFV
<i>Culex quinquefasciatus</i>	Urbano	125	11	9	0,07	81,8	CXFV
	Semiurbano	1	1				
<i>Culex (Culex)</i> spp.	Urbano						
	Semiurbano	130	5	4	0,03	80	CXFV
<i>Total</i>		1486	74	53			

Tabla 1: Valores de la Tasa Mínima de Infección (TMI) y porcentaje de los pools positivos por especie y tipo de ambiente estudiado.

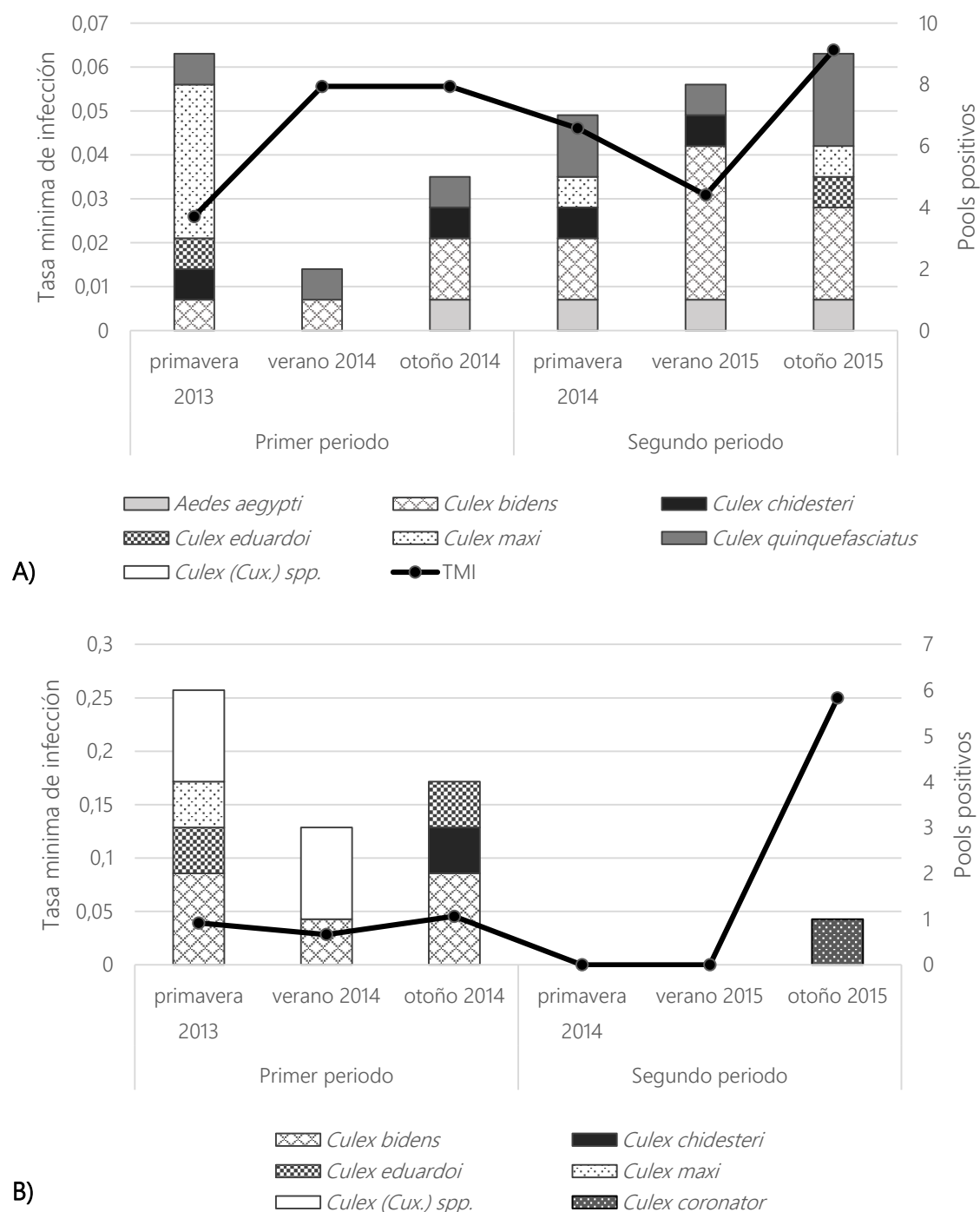
DINÁMICA ESPACIO-TEMPORAL DE LOS ISF DETECTADOS Y TASA MÍNIMA DE INFECCIÓN.

En relación a la actividad de los ISF, la especie con TMI mayor fue *Cx. coronator* presente únicamente en el ambiente semiurbano. De las especies presentes en ambos ambientes, *Cx. eduardoi* y *Cx. maxi* presentaron mayor TMI en al ambiente semiurbano, en el ambiente urbano *Cx. bidens* y *Cx. chidesteri* fueron las especies que presentaron TMI más alta (Tabla 1).

En el ambiente urbano, la menor actividad viral registrada es en primavera del primer periodo y en verano del segundo periodo, y la mayor actividad viral registrada de todas las estaciones climáticas ocurre en otoño del segundo periodo.

En el ambiente semiurbano la actividad viral del primer periodo entre estaciones fue muy similar, con una leve disminución durante la primavera. En el segundo periodo se registró actividad viral únicamente durante el otoño.

Flavivirus presentes en diferentes ambientes de la ciudad de Resistencia y su dinámica espacio-temporal



ANÁLISIS FILOGENÉTICO

Previo al análisis filogenético, se evaluaron los modelos de distancia más adecuado para los datos (Tabla 2 en anexo), dando como resultado el modelo de distancia Kimura 2 con una distribución Gamma discreta para modelar las diferencias de tasas evolutivas entre sitios (5 categorías (+ G, parámetro = 0.6945)). El modelo de variación de la tasa permitió que algunos sitios fueran evolutivamente invariables ([+ I], sitios 34.37%) (Tabla 2 en anexo).

Para el análisis filogenético se utilizó una secuencia por grupo de los 53 totales, debido a que muchas de ellas son idénticas. Este análisis filogenético involucró 72 secuencias nucleotídicas pertenecientes a 51 especies de *Flavivirus* y hubo un total de 62 posiciones en el conjunto de datos final. Si bien el fragmento analizado es pequeño y los valores de certidumbre obtenidos por muestreo aleatorio (bootstrap) no son muy altos, la topología del árbol confirma los datos de homología obtenidos en el Blastn. En la figura 2 se muestra el árbol con la probabilidad de registro más alta y el porcentaje de árboles en los que se agrupan los taxones asociados se muestra junto a las ramas.

El análisis filogenético de las secuencias de este fragmento del gen NS5 dieron como resultado la formación de dos grandes grupos bien diferenciados, el primero formado por secuencias pertenecientes a ISF y un segundo grupo que a su vez se subdividió en subgrupos conformados por las secuencias pertenecientes a los grupos ecológicos TBV, MBV y NKV (Figura 2).

Flavivirus presentes en diferentes ambientes de la ciudad de Resistencia y su dinámica espacio-temporal

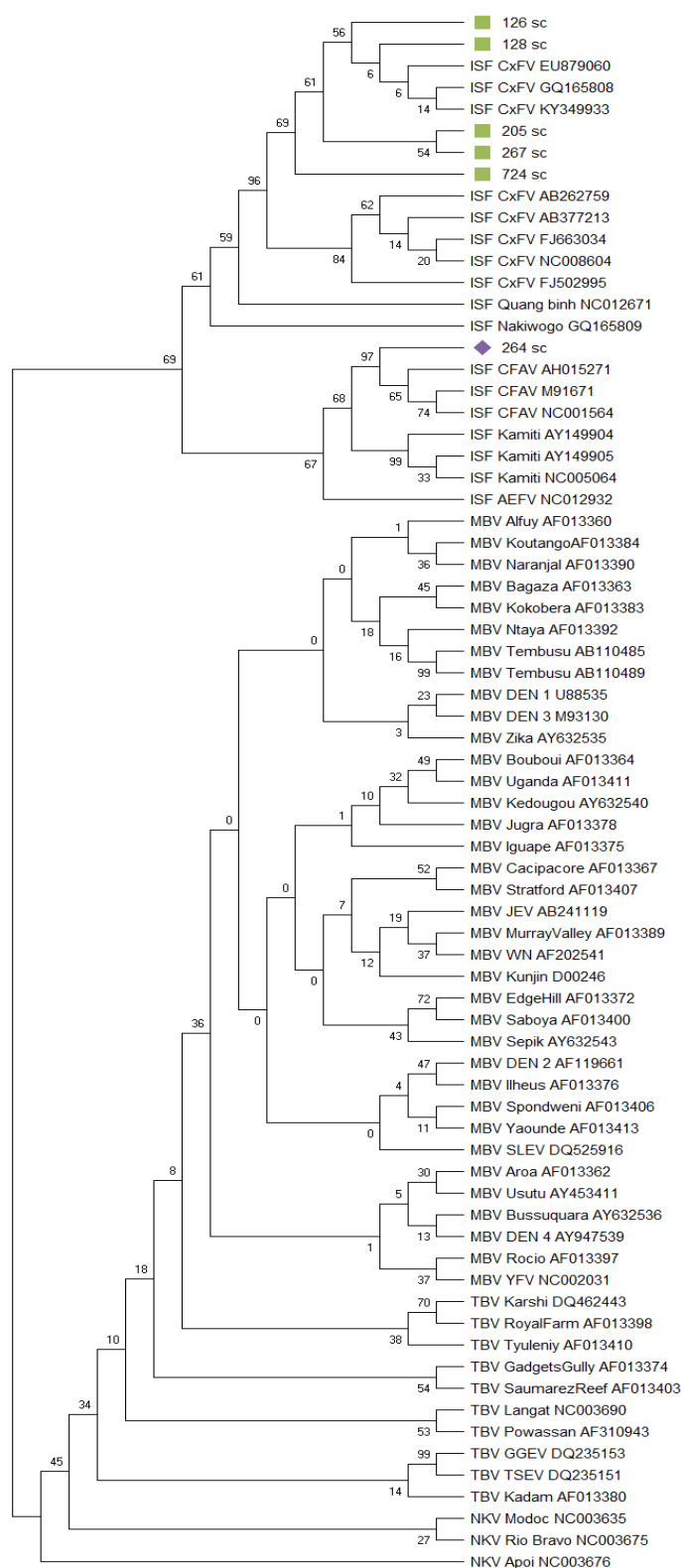


Figura 2: Árbol filogenético de los *Flavivirus* basado en 62 nucleótidos del gen NS5 realizado por el método de inferencia Maximum Likelihood, modelo de distancia Kimura 2 con un valor de certidumbre de 1500 réplicas. Las secuencias obtenidas en el presente trabajo son denominadas por *nºpoolsc*, en color lila las secuencias obtenidas de pools de mosquitos *Ae. aegypti* y en color verde las secuencias obtenidas de pools *Culex (Cux.)*. Las secuencias obtenidas de la base de datos se nombraron por grupo ecológico, virus y número de registro.

Para el caso de las secuencias relacionadas con ISF, podemos ver la existencia de dos clados: aquellos ISF asociados a *Aedes* (KRV, AEFV y CFA) y los asociados a mosquitos del género *Culex* (CXFV). La secuencia 264sc obtenida de *pool* de *Ae. aegypti*, se agrupan con alto valor de soporte (97% de certidumbre) con CFAV. El resto de las secuencias consenso obtenidas de mosquitos *Culex* (*Cux.*) agrupó con un 96% de valor de bootstrap con CXFV, particularmente con cepas obtenidas de mosquitos *Cx. quinquefasciatus* de Brasil (KY349933), México (EU879060) y África (GQ165808) (Figura 2).

INFECCIÓN NATURAL CON SLEV

Los *pools* positivos no secuenciados por su calidad de amplicón, sumaron un total de 26, los cuales fueron testeados para el virus SLEV, dando como resultado un *pool* positivo de la especie *Cx. edwardoi* colectado durante la primavera del primer periodo en el ambiente urbano, la TMI fue de 0,03.

Considerando las complejas redes ecológicas de transmisión que presentan los *Flavivirus* multi-hospedador multi-vector, es fundamental realizar investigaciones enfocadas en la detección de estos virus en mosquitos ya que, a diferencia de los estudios serológicos, estos datos brindan una información más precisa sobre el tiempo-espacio en los que circulan estos virus. Los mosquitos cumplen un rol fundamental en la replicación y transmisión de los *Flavivirus*, al menos en los grupos ecológicos, *Flavivirus* transmitidos por mosquitos (MBV) y los *Flavivirus* específicos de insectos (ISF), por lo tanto, la abundancia y la dinámica espacio-temporal de los mosquitos son elementos clave para poder describir parte de esta compleja red ecológica que caracteriza a los *Flavivirus*.

En la ciudad de São José do Rio Preto (SJRP), Brasil área caracterizada con un clima tropical, se observó que la distribución de los ISF, en particular de los CxFV inició en la estación seca (Julio 2007) en zonas con nivel socioeconómico bajo y medio, aunque a medida que pasaron los meses se extendió a todas las zonas socioeconómicas (Machado et al., 2012). En nuestro trabajo, la circulación de ISF se presentó en los dos ambientes, tanto urbano como semiurbano, y a diferencia de CxFV detectado en Brasil durante la época seca, la mayor actividad viral registrada para ISF en Resistencia (clima subtropical) fue durante el otoño del segundo periodo, estación climática que se caracteriza, en nuestra región, por presentar un pico máximo de precipitación (marzo-mayo) (Bruniard 1978); no obstante, solo en el ambiente urbano los ISF estuvieron presentes en todas las estaciones de los dos

periodos de estudio, en el ambiente semiurbano no se detectó actividad viral durante el inicio del segundo periodo (primavera-verano). La disminución en la circulación de ISF en algunas estaciones climáticas podría deberse a la baja de las poblaciones de mosquitos en los que fueron detectados (Blitvich et al., 2010; Machado et al., 2012), aunque Kim et al., (2009) no detectó CxFV a pesar de las poblaciones de mosquito fueran abundantes, y Blitvich et al., (2010), en algunos estados donde la tasa mínima de infección fue la más alta, la población de mosquitos fue baja (Blitvich et al., 2010).

El análisis filogenético demostró que las secuencias obtenidas en este trabajo, de diferentes especies de mosquitos *Culex* (*Culex*) spp., están más estrechamente relacionadas con las cepas de CxFV aislados de *Culex quiquefasciatus* colectados en Mexico, Brazil, y Uganda que con las obtenidas en Iowa y Japón. Datos que coinciden con CxFV aislados en mosquitos *Culex* de la provincia de Corrientes (análisis filogenético del fragmento del gen de la proteína E) (Goenaga et al., 2014). Es decir que las cepas CxFV de Resistencia y Corrientes (Goenaga et al., 2014) estarían más relacionadas a las cepas del clado América Latina/Caribe que con las cepas de Estados Unidos/Asia (Blitvich et al., 2010; Cook et al., 2009).

Un segundo ISF, el virus Cell Fusing Agent (CFAV), fue detectado en mosquitos *Ae. aegypti* colectados en el ambiente urbano de la ciudad de Resistencia. Las secuencias de los tres *pools* fueron idénticas entre ellas, no así con las secuencias depositadas en la base de datos, sugiriendo que podrían ser una

cepa de CFAV, no obstante, es necesario realizar mayores estudios para poder confirmar esta hipótesis. Las secuencias obtenidas de una porción del gen NS5 y contrastadas con la base de datos del GenBank dieron una identidad de 97% con CFAV cepa Culebra, Galveston, Mex AR269 entre otras. A pesar de estas diferencias genéticas, Kuno et al., (1998), define una especie viral como un grupo de virus con >84% de identidad de secuencia de nucleótidos entre ellos (Kuno et al., 1998), es decir que los resultados obtenidos en el presente trabajo corresponden a una especie viral; sin embargo, no se desestima la posibilidad de que puedan ser una cepa diferentes a las registradas en la base de datos.

Se ha documentado que la existencia de ISF en los mosquitos puede afectar la competencia vectorial para la transmisión de MBV. La mayoría de los estudios indican que los ISF pueden tener un efecto negativo en la replicación de *Flavivirus* patógenos (Bolling et al., 2015, 2012; Nasar et al., 2015), sin embargo, muchos trabajos han documentado una interacción positiva, por ejemplo: se ha documentado que CFAV promovió significativamente la replicación de DENV en líneas celulares *Ae. aegypti*, particularmente si las células ya estaban infectadas con CFAV antes de la infección por DENV (Zhang et al., 2017); también se observó una interacción positiva entre CXFV y WNV en mosquitos *Cx. quinquefasciatus* (Kent et al., 2010). Sin embargo, todavía no está claro el rol funcional que podrían tener los CFAV en relación a otros *Flavivirus* y en el ciclo de vida de los mosquitos. Además, se han descrito fragmentos de secuencias de CFAV integrada al genoma de los

mosquitos (Crochu et al., 2004), de lo cual todavía se desconoce el mecanismo y el rol funcional que podrían tener.

En relación a SLEV, los vectores propuestos en ambientes urbanos y periurbanos de la provincia de Córdoba son *Cx. quinquefasciatus* y *Cx. Interfor* (Diaz et al., 2009; Batallán et al., 2015). Diaz et al., (2012) encuentra, además, infección natural por SLEV en otras especies de mosquitos, *Ae. aegypti*, *Oc. scapularis*, *Oc. albifasciatus*, *Ps. ferox* y *An. albitarsis* en la ciudad de Córdoba, y Mitchell et al., (1985) en *Cx. quinquefasciatus* y *Culex* spp. en la provincia de Santa Fe. A pesar de que *Cx. quinquefasciatus* está presente en la provincia de Chaco y es muy abundante en los ambientes urbanos (Stein et al., 2016, 2013), son escasos los datos sobre infección natural en mosquitos con SLEV. El único antecedente previo de circulación autóctona de SLEV en Resistencia corresponde a un *pool* de *Ae. aegypti* colectado en esta ciudad en Marzo de 2004 (datos no publicados - <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/FJ361870.1>). La detección de *Ae. aegypti* infectados con SLEV es algo frecuente según otros trabajos (Diaz et al., 2012, Batallán 2010), sin embargo, debido a su preferencia alimentaria por mamíferos/humanos se desestima su rol como vector para el SLEV ya que este amplifica en aves.

Recientes aportes al tema, nuestro grupo de trabajo ha detectado SLEV en mosquitos *Cx. chidesteri* y *Cx. quinquefasciatus* (entre otras especies de otros géneros) en diferentes ambientes de la localidad Pampa del Indio, ubicada a 200 Km al norte de la ciudad de Resistencia (Oria et al., 2018). Por lo tanto, los mosquitos

Cx. eduardoi colectados en la ciudad de Resistencia y hallados con infección natural con SLEV en el presente trabajo, representa el primer registro de infección natural con SLEV para la especie en Argentina.

En relación a los patrones estacionales, Oria et al., (2018) describen las prevalencias de anticuerpos (Ac) contra SLEV en equinos en tres localidades de Chaco, la ciudad de Resistencia presenta las mayores prevalencias de Ac contra SLEV durante el otoño de 2013 momento antes del inicio del presente estudio, aunque también se detectaron en verano de 2014, por lo que podemos decir que la circulación ocurre tanto en verano, como en otoño y primavera.

En la región templada, los periodos de mayor actividad del SLEV se concentran a finales del verano e inicios del otoño (Díaz et al., 2009). Oria et al., (2018), registró en Pampa del Indio (Chaco intermedio) el otoño como mayor pico de actividad para el virus. Así también, el patrón de actividad temporal de los virus en una determinada región, podría ser el resultado de su dinámica espacial a partir de producirse múltiples introducciones intermitentes por aves desde regiones vecinas (Kramer et al., 1997). Diaz et al., (2012) afirman que la epidemia de 2005 por SLEV fue resultado de la introducción a la ciudad de Córdoba de la cepa virulenta desde zonas periurbanas en los meses previos, siendo que un año antes de la misma estudios sobre las poblaciones de mosquitos no la detectaron, detectando si las cepas no virulentas II, V y VII. Este patrón observado en la región templada podría presentarse también en la región subtropical como la nuestra, ya que el pool positivo de SLEV sólo se detectó en la primavera del 2013 y luego no fue detectado

en los años subsiguientes, indicando una posible dinámica de introducción-extinción en el área de estudio desde un sitio a otro.

Por otro lado, en el presente estudio el vector secundario de SLEV para el área templada *Cx. bidens/interfor* fue la segunda especie del género *Culex* más abundante. Hasta el momento no ha sido hallada infectada con SLEV en toda el área de estudio por nuestro grupo de trabajo, pero ensayos de competencia vectorial confirman su susceptibilidad de la infección y transmisión del virus (Beranek et al., 2018).

- Batallán GP, Estallo EL, Flores FS, Sartor P, Contigiani MS, Almirón WR. St. Louis Encephalitis virus mosquito vectors dynamics in three different environments in relation to remotely sensed environmental conditions. *Acta Trop* 2015;146:53–9. doi:10.1016/j.actatropica.2015.03.009.
- Beranek M, Quaglia AI, Peralta GC, Diaz LA, Stein M, Almirón WR, et al. Competencia vectorial del virus St. Louis encephalitis (Flavivirus: Flaviviridae) en dos poblaciones de *Culex quinquefasciatus* de Córdoba y Resistencia. La Rioja, Argentina: XI Jornadas Regionales sobre Mosquitos; 2018.
- Beskow G, Spinsanti LI, Stein M, Gorodner J, Contigiani MS. Seroprevalencia de flavivirus y alfavirus en humanos en el NEA. Resultados preliminares. *Rev La Fac Med La Univ Nac Del Nord* 2007;25:41.
- Blitvich BJ, Lin M, Dorman KS, Soto V, Hovav E, Bradley J, et al. Genomic Sequence and Phylogenetic Analysis of *Culex* Flavivirus, an Insect-Specific Flavivirus, Isolated From *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) in Iowa. *J Med Entomol* 2010;46:934–41.
- Bolling BG, Eisen L, Moore CG, Blair CD. Insect-specific flaviviruses from *Culex* mosquitoes in Colorado, with evidence of vertical transmission. *Am J Trop Med Hyg* 2011;85:169–77. doi:10.4269/ajtmh.2011.10-0474.
- Bolling BG, Olea-Popelka FJ, Eisen L, Moore CG, Blair CD. Transmission dynamics of an insect-specific flavivirus in a naturally infected *Culex pipiens* laboratory colony and effects of co-infection on vector competence for West Nile virus. *Virology* 2012;427:90–7. doi:10.1016/j.virol.2012.02.016.
- Bolling BG, Weaver SC, Tesh RB, Vasilakis N. Insect-Specific Virus Discovery: Significance for the Arbovirus Community. *Viruses* 2015;7:4911–28. doi:10.3390/v7092851.
- Bruniard ED. El Gran Chaco Argentino. In: UNNE F de H, editor. Geográfica. Rev. del Inst. Geogr., Resistencia, Chaco: 1978.
- Cook S, Moureau G, Harbach RE, Mukwaya L, Goodger K, Ssenfuka F, et al. Isolation of a novel species of flavivirus and a new strain of *Culex* flavivirus (Flaviviridae) from a natural mosquito population in Uganda. *J Gen Virol* 2009;90:2669–78. doi:10.1099/vir.0.014183-0.
- Crabtree MB, Nga PT, Miller BR. Isolation and characterization of a new mosquito flavivirus, Quang Binh virus, from Vietnam. *Arch Virol* 2009;154:857–60. doi:10.1007/s00705-009-0373-1.
- Crochu S, Cook S, Attoui H, Charrel RN, De Chesse R, Belhouchet M, et al. Sequences of flavivirus-related RNA viruses persist in DNA form integrated in the genome of *Aedes* spp. mosquitoes. *J Gen Virol* 2004;85:1971–80. doi:10.1099/vir.0.79850-0.
- Diaz LA. Patrones de actividad del VSLE en Córdoba. Universidad Nacional de Cordoba, 2009.
- Díaz LA, Llinás G, Vázquez A, Tenorio A, Contigiani MS. Silent circulation of St. Louis encephalitis virus prior to an encephalitis outbreak in Cordoba, Argentina (2005). *PLoS Negl Trop Dis* 2012;6. doi:10.1371/journal.pntd.0001489.
- Diaz LA, Occelli M, Almeida FL, Almirón WR, Contigiani MS. Eared Dove (*Zenaida auriculata*, Columbidae) as Host for St. Louis Encephalitis Virus (Flaviviridae, Flavivirus). *Vector-Borne Zoonotic Dis* 2008;8:277–82. doi:10.1089/vbz.2007.0168.

- Goenaga S, Fabbri CM, García JB, Rondán JC, Gardenal N, Calderón GE, et al. New strains of *Culex flavivirus* isolated in Argentina. *J Med Entomol* 2014;51:900–6.
- Hobson-Peters J, Yam AWY, Lu JWF, Setoh YX, May FJ, Kurucz N, et al. A New Insect-Specific Flavivirus from Northern Australia Suppresses Replication of West Nile Virus and Murray Valley Encephalitis Virus in Co-infected Mosquito Cells. *PLoS One* 2013;8:e56534. doi:10.1371/journal.pone.0056534.
- Hoshino K, Isawa H, Tsuda Y, Yano K, Sasaki T, Yuda M, et al. Genetic characterization of a new insect flavivirus isolated from *Culex pipiens* mosquito in Japan. *Virology* 2007;359:405–14. doi:10.1016/j.virol.2006.09.039.
- Hotez PJ. Global urbanization and the neglected tropical diseases. *PLoS Negl Trop Dis* 2017;11:e0005308. doi:10.1371/journal.pntd.0005308.
- Junglen S, Kopp A, Kurth A, Pauli G, Ellerbrok H, Leendertz FH. A new flavivirus and a new vector: characterization of a novel flavivirus isolated from *Uranotaenia* mosquitoes from a tropical rain forest. *J Virol* 2009;83:4462–8. doi:10.1128/JVI.00014-09.
- Kent RJ, Crabtree MB, Miller BR. Transmission of West Nile Virus by *Culex quinquefasciatus* Say Infected with *Culex Flavivirus* Izabal. *PLoS Negl Trop Dis* 2010;4:e671. doi:10.1371/journal.pntd.0000671.
- Kim DY, Guzman H, Bueno R, Dennett JA, Auguste AJ, Carrington CVF, et al. Characterization of *Culex Flavivirus* (Flaviviridae) strains isolated from mosquitoes in the United States and Trinidad. *Virology* 2009;386:154–9. doi:10.1016/j.virol.2008.12.034.
- Kramer LD, Jackson AO, Presser SB, Hardy JL. Genotypic and Phenotypic Variation of Selected Saint Louis Encephalitis Viral Strains Isolated in California. *Am J Trop Med Hyg* 1997;57:222–9. doi:10.4269/ajtmh.1997.57.222.
- Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Mol Biol Evol* 2018;35:1547–9.
- Kuno G, Chang GJ, Tsuchiya KR, Karabatsos N, Cropp CB. Phylogeny of the genus *Flavivirus*. *J Virol* 1998;72:73–83. doi:10.1006/mpev.2000.0874.
- Machado DC, Mondini A, dos Santos Santana V, Yonamine PTK, Chiaravalloti Neto F, de Andrade Zanotto PM, et al. First identification of *Culex flavivirus* (Flaviviridae) in Brazil. *Intervirology* 2012;55:475–83. doi:10.1159/000337166.
- Mitchell CJ, Monath TP, Sabattini MS, Daffner JF, Cropp CB, Calisher CH, et al. Arbovirus isolations from mosquitoes collected during and after the 1982-1983 epizootic of western equine encephalitis in Argentina. *Am J Trop Med Hyg* 1987;36:107–13. doi:10.4269/ajtmh.1987.36.107.
- Monath TP, Sabattini MS, Mitchell CJ, Bowen GS, Service PH, Services H, et al. ARBOVIRUS INVESTIGATIONS IN ARGENTINA, 1977-1980 SURVEYS 1985;34:966–75.
- Nasar F, Erasmus JH, Haddow AD, Tesh RB, Weaver SC. Eilat virus induces both homologous and heterologous interference. *Virology* 2015;484:51–8. doi:10.1016/j.virol.2015.05.009.
- Oria GI. Patrones de Distribución espacio-temporal de Flavivirus (Flaviviridae) en Pampa del Indio, provincia de Chaco. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales Y Agrimensura. Universidad Nacional del Nordeste, 2018.

*Flavivirus presentes en diferentes ambientes de la ciudad de Resistencia
y su dinámica espacio-temporal*

- Oria GI, Spinsanti LI, Pirota VL, Martinez F, Stechina OS, Etchepare E, et al. Seroprevalence of Flavivirus in horses in Chaco, Argentina. Circulation during 2013-2014. Brazilian J Vet Med 2018a;40:1-10. doi:10.29374/2527-2179.bjvm045118.
- Oria GI, Stechina OS, Diaz LA, Stein M. Flavivirus (Flaviviridae) específicos (ISFs) detectados en mosquitos de Pampa del Indio, Chaco. 2018b.
- Ré V, Spinsanti L, Farías A, Díaz A, Vázquez A, Aguilar J, et al. Reliable detection of St. Louis encephalitis virus by RT-nested PCR. Enferm Infecc Microbiol Clin 2008;26:10-5. doi:10.1157/13114389.
- Sabattini MS, Monath TP, Bowen GS, Control D, Service PH, Services H, et al. Arbovirus investigations in Argentina ,aspects and description of study sites. Am J Trop Med Hyg 1985;34:937-44.
- Sánchez-Seco MP, Rosario D, Domingo C, Hernández L, Valdés K, Guzmán MG, et al. Generic RT-nested-PCR for detection of flaviviruses using degenerated primers and internal control followed by sequencing for specific identification. J Virol Methods 2005;126:101-9. doi:10.1016/j.jviromet.2005.01.025.
- Spinsanti LI, Díaz LA, Glatstein N, Arselán S, Morales MA, Farías AA, et al. Human outbreak of St. Louis encephalitis detected in Argentina, 2005. J Clin Virol 2008;42:27-33. doi:10.1016/j.jcv.2007.11.022.
- Stein M, Santana M, Galindo LM, Etchepare E, Willener JA, Almirón WR. Culicidae (Diptera) community structure, spatial and temporal distribution in three environments of the province of Chaco, Argentina. Acta Trop 2016;156:57-67. doi:10.1016/j.ACTATROPICA.2015.12.002.
- Stein M, Zalazar L, Willener JA, Almeida FL, Almirón WR, Stein M, et al. Culicidae (Diptera) selection of humans, chickens and rabbits in three different environments in the province of Chaco, Argentina. Mem Inst Oswaldo Cruz 2013;108:563-71. doi:10.1590/S0074-02762013000500005.
- Wang Z, An S, Wang Y, Han Y, Guo J. A new virus of flavivirus: Chaoyang virus isolated in Liaoning province. Chinese J Public Heal 2009;25:769-72.
- World Health Organization. WHO | Urban population growth. WHO 2015.
- Zhang G, Asad S, Khromykh AA, Asgari S. Cell fusing agent virus and dengue virus mutually interact in Aedes aegypti cell lines. Sci Rep 2017;7:1-8. doi:10.1038/s41598-017-07279-5.

CAPÍTULO IV

Consideraciones finales

La evidencia presentada anteriormente demuestra que la riqueza y diversidad de culícidos se presenta a modo de gradiente, disminuyendo desde el ambiente con menos modificación antrópica hacia el ambiente más modificado. Además, parches verdes en ambientes urbanos, generan una heterogeneidad en el paisaje brindando diferentes microhábitats propicios para que un mayor número de especies de culícidos puedan desarrollarse. En futuros estudios, se podría caracterizar la estructura del paisaje con variables macroambientales y, junto a los datos obtenidos de las comunidades de culícidos del presente estudio, extrapolar los datos a otros ambientes.

Si bien las variables climáticas no correlacionaron de manera significativa con las abundancias de la mayoría de las especies de mosquitos halladas, se pudo observar que las mayores abundancias ocurrieron en la época cálida y con mayores precipitaciones. Por otro, lado el hallazgo de una correlación negativa y significativa entre la precipitación media mensual y las abundancias de *Cx. quinquefasciatus*, especie de interés sanitario hallada durante todo el período de la presente investigación, requieren de mayores estudios que permitan identificar qué otros aspectos de esta variable como ser la frecuencia de las precipitaciones o el número de días de lluvia, podrían afectar las abundancias de la especie, más que las estaciones climáticas. Asimismo, es necesario profundizar los estudios sobre la bionomía de las especies *Cx. quinquefasciatus*, *Cx. bidens/interfor*, *Cx. chidesteri*, *Cx. maxi* y *Cx. eduardoi* en el área de estudio, dado que están implicados como

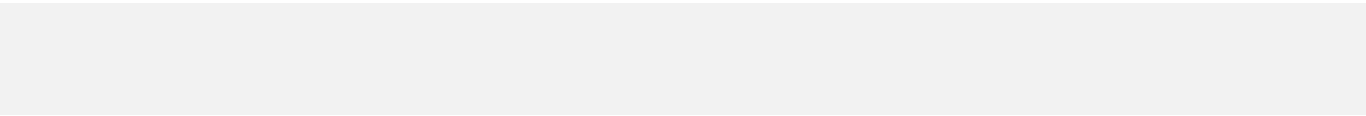
vectores principales y putativos siendo el caso de las dos primeras, como así también se hallaron naturalmente infectadas en el caso de las 3 últimas con SLEV en la región.

Finalmente, se detectaron *Flavivirus* pertenecientes a los dos grupos ecológicos que implican a los mosquitos, los virus específicos de mosquitos (ISF) en su gran mayoría y el virus SLEV del grupo de los virus transmitidos por mosquitos (MBV). De éste último se enfocó la búsqueda en los mosquitos del género *Culex* subgénero *Culex* dada su conocida participación en las tramas generalistas de transmisión del virus, aunque es necesario continuar con otras investigaciones: 1) ampliar la búsqueda para detección de SLEV hacia especies de otros géneros por la posibilidad del mantenimiento de ciclos enzoóticos que no involucren aves; 2) en éste sentido se requieren estudios que permitan detectar posibles infecciones en mamíferos como los roedores, en el área de estudio; por otro lado 3) para comprender mejor la dinámica de la transmisión en nuestra región es imprescindible iniciar estudios para identificar las aves, posibles hospedadores vertebrados de este virus en la ciudad de Resistencia y alrededores como así también 4) se requiere la identificación del genotipo detectado, ya que para Argentina se han detectado más de un genotipo y sólo uno se ha asociado a las epidemias ocurridas en diferentes años y localidades; 5) asimismo evaluar la circulación de SLEV de manera retrospectiva (dado que se cuenta con muestras de 2004-2005 resultado de investigaciones anteriores) lo que permitirá conocer si diferentes genotipos han circulado, si han ocurrido diferentes introducciones de

diferentes genotipos en el tiempo, como así también si el o los genotipos detectados, presentan una distribución espacial restringida sólo a un sitio de la ciudad de Resistencia (como fue detectado en el presente estudio) o si su distribución es más amplia dentro de la ciudad y fuera de ella, en el ambiente semiurbano.

La identificación molecular y el análisis filogenético de los ISF, mostraron una alta homología, con los virus CxFV y CFAV. El análisis filogenético agrupó CxFV detectados en mosquitos *Culex* (*Culex*) con las cepas Latino Americanas/Caribe y CFAV detectados en mosquitos *Ae. aegypti* con cepas provenientes de América. Sin embargo, se conoce muy poco sobre su dispersión, ecología y las implicancias que podrían tener en la transmisión de los *Flavivirus* de importancia para la salud (MBV). De allí la necesidad de: 1) ampliar el rango de búsqueda de los mismos a otros géneros y especies que no han sido analizadas en el presente estudio a pesar de haber sido capturadas; 2) evaluar su posible participación en los fenómenos de transmisión de los MBV, en períodos epidémicos e interepidémicos; 3) e identificar los efectos que podrían tener en el ciclo de vida de los mosquitos.

ANEXO



CAPÍTULO II

Tabla 2: Abundancia total de especies mosquitos por sitio de colecta, desde otoño 2013 a primavera 2015.
(MA) Monte Alto, (R) Regimiento, (VN) Vialidad.

Especies	MA	R	VN	Total
<i>Aedeomyia squamipennis</i>	21	63	20	104
<i>Aedes (Och.) spp.</i>	631	1	0	632
<i>Aedes aegypti</i>	0	2	72	74
<i>Aedes albifasciatus</i>	4	16	0	20
<i>Aedes crinifer</i>	13	0	0	13
<i>Aedes fulvus</i>	8	0	0	8
<i>Aedes hastatus/oligopistus</i>	148	9	4	161
<i>Aedes scapularis</i>	2760	845	469	4074
<i>Aedes stigmaticus</i>	40	2	3	45
<i>Anopheles (Ano.) spp.</i>	31	16	4	51
<i>Anopheles (Nys.) spp.</i>	278	132	33	443
<i>Anopheles albitarsis</i>	1	5	3	9
<i>Anopheles argyritarsis</i>	1	0	0	1
<i>Anopheles deaneorum</i>	0	1	0	1
<i>Anopheles evansae</i>	2	0	0	2
<i>Anopheles galvaoi</i>	3	0	0	3
<i>Anopheles neomaculipalpus</i>	1	11	0	12
<i>Anopheles triannulatus</i>	14	5	0	19
<i>Coquillettidia albicosta</i>	26	15	1	42
<i>Coquillettidia nigricans</i>	177	149	32	358
<i>Coquillettidia shannoni</i>	1	2	1	4
<i>Coquillettidia spp.</i>	87	36	0	123
<i>Culex (Cux.) spp.</i>	699	1709	327	2735
<i>Culex (Mel.) spp.</i>	260	70	6	336
<i>Culex ameliae</i>	8	0	0	8
<i>Culex bastagarius</i>	0	1	0	1
<i>Culex bidens</i>	271	382	187	840
<i>Culex chidesteri</i>	193	165	98	456
<i>Culex clarki</i>	4	0	0	4
<i>Culex coronator</i>	4	13	0	17
<i>Culex delpontei</i>	201	114	25	340
<i>Culex eduardoi</i>	34	88	28	150

Tabla 2 (Cont.): Abundancia total de especies mosquitos por sitio de colecta, desde otoño 2013 a primavera 2015.

(MA) Monte Alto, (R) Regimiento, (VN) Vialidad.

<i>Culex educator</i>	3	3	6	12
<i>Culex intricatus</i>	10	2	0	12
<i>Culex maxi</i>	31	527	61	619
<i>Culex ocosa</i>	8	63	0	71
<i>Culex pilosus</i>	1	0	0	1
<i>Culex quinquefasciatus</i>	1	37	123	161
<i>Culex taeniopus</i>	5	0	0	5
<i>Mansonia flaveola</i>	2	1	0	3
<i>Mansonia humeralis</i>	92	11	2	105
<i>Mansonia indubitans</i>	0	0	4	4
<i>Mansonia spp.</i>	164	85	124	373
<i>Mansonia titillans</i>	431	1591	678	2700
<i>Psorophora (Gra.) spp.</i>	37	3	0	40
<i>Psorophora (Jan.) spp.</i>	135	58	0	193
<i>Psorophora (Pso.) spp.</i>	7	0	0	7
<i>Psorophora albigena</i>	20	15	0	35
<i>Psorophora ciliata</i>	25	83	7	115
<i>Psorophora confinnis</i>	0	14	6	20
<i>Psorophora cyanescens</i>	67	66	19	152
<i>Psorophora dimidiata</i>	1	3	1	5
<i>Psorophora discrucians</i>	4	0	0	4
<i>Psorophora ferox</i>	33	7	2	42
<i>Psorophora pallescens</i>	4	17	0	21
<i>Psorophora paulli</i>	13	2	7	22
<i>Psorophora varinervis</i>	2	65	30	97
<i>Uranotenia lowii</i>	1	0	0	1
<i>Uranotenia spp.</i>	0	7	0	7
<i>Wyeomia (Pho.) spp.</i>	65	0	0	65
<i>Wyeomyia muehlensi</i>	19	0	0	19
Total	7102	6512	2383	15997

Tabla 5: Abundancia de especies mosquitos por estación durante los dos períodos analizados en los tres sitios estudiados (primavera 2013 hasta otoño 2015).

Especie de Mosquito	Primer periodo			Segundo periodo		
	2013	2014	2015	2014	2015	2015
	primavera	verano	otoño	primavera	verano	otoño
<i>Aedeomyia squamipennis</i>	64	1	3	21	3	10
<i>Aedes (Och.) spp.</i>	81	6	264		278	2
<i>Aedes aegypti</i>		1	17	35	5	15
<i>Aedes albifasciatus</i>		8	3			
<i>Aedes crinifer</i>			4		9	
<i>Aedes fulvus</i>			3			5
<i>Aedes hastatus/oligopistus</i>	23	45	66	1	8	6
<i>Aedes scapularis</i>	1329	1075	887	68	487	117
<i>Aedes stigmaticus</i>	27	2	10		3	
<i>Anopheles (Ano.) spp.</i>	2	3	23	5	16	
<i>Anopheles (Nys.) spp.</i>	7	81	153	59	69	28
<i>Anopheles albitarsis</i>	2	1	1		4	1
<i>Anopheles argyritarsis</i>						
<i>Anopheles deaneorum</i>				1		
<i>Anopheles evansae</i>						2
<i>Anopheles galvaoi</i>						
<i>Anopheles neomaculipalpus</i>					11	
<i>Anopheles triannulatus</i>	1	1				7
<i>Coquillettidia albicosta</i>	7	14			19	2
<i>Coquillettidia nigricans</i>	13	81	70	42	99	46
<i>Coquillettidia shannoni</i>	1			1	1	1
<i>Coquillettidia (Rhy.) spp.</i>	17	12	22	3	63	3
<i>Culex (Cux.) spp.</i>	621	197	219	401	502	584
<i>Culex (Mel.) spp.</i>	3	8	18	13	248	45
<i>Culex ameliae</i>						8
<i>Culex bastagarius</i>		1				
<i>Culex bidens</i>	133	67	88	62	258	145
<i>Culex chidesteri</i>	82	64	44	84	7	33
<i>Culex clarki</i>			4			
<i>Culex coronator</i>				4		13
<i>Culex delpontei</i>		20	26	9	92	188
<i>Culex eduardoi</i>	62	22	28		13	5

Tabla 5 (Cont.): Abundancia de especies mosquitos por estación durante los dos períodos analizados en los tres sitios estudiados (primavera 2013 hasta otoño 2015).

<i>Culex educator</i>			3	1	2	1
<i>Culex intricatus</i>		2	4	1		4
<i>Culex maxi</i>	357	24		30	39	128
<i>Culex ocossa</i>	3	3	1		54	10
<i>Culex pilosus</i>		1				
<i>Culex quinquefasciatus</i>	14	8	33	26	11	42
<i>Culex taeniopus</i>						5
<i>Mansonia flaveola</i>		2		1		
<i>Mansonia humeralis</i>	1	35	5	25		15
<i>Mansonia indubitans</i>			4			
<i>Mansonia (Man.) spp.</i>	10	115	64	69	75	2
<i>Mansonia titillans</i>	96	319	119	1208	441	288
<i>Psorophora (Gra.)spp.</i>	3		27		10	
<i>Psorophora (Jan.) spp</i>	35	14	5	2	133	2
<i>Psorophora (Pso.) spp</i>					7	
<i>Psorophora albigenu</i>	1		6	1	25	2
<i>Psorophora ciliata</i>	7	2	24		80	1
<i>Psorophora confinnis</i>	2	5	1		10	
<i>Psorophora cyanescens</i>	17	16	39	4	76	
<i>Psorophora dimidiata</i>	2			1		1
<i>Psorophora discruciens</i>	4					
<i>Psorophora ferox</i>	4	3	13		6	10
<i>Psorophora pallescens</i>	5	1	2		13	
<i>Psorophora paulli</i>		13			9	
<i>Psorophora varinervis</i>	55	4		1	29	
<i>Uranotaenia lowii</i>		1				
<i>Uranotenia (Ura.) spp.</i>						7
<i>Wyeomyia (Pho) spp.</i>		1	13		51	
<i>Wyeomyia muehlensi</i>				1	11	7
Total	3091	2279	2316	2180	3277	1791

CAPÍTULO III

Model	#Param	BIC	AICc	lnL	Invariant	Gamma	R	Freq A	Freq T	Freq C	Freq G	A=>T	A=>C	A=>G	T=>A	T=>C	T=>G	C=>A	C=>T	C=>G	G=>A	G=>T	G=>C
K2+G+I	254	5628,287967	387,4574545	-1674,786157	0,337432773	0,648098839	1,512156308	0,25	0,25	0,25	0,25	0,05	0,05	0,15	0,05	0,15	0,05	0,05	0,15	0,05	0,15	0,05	0,05
K2+G	253	5632,405938	388,528272	-1661,330003	n/a	0,343252287	1,469793161	0,25	0,25	0,25	0,25	0,05	0,05	0,15	0,05	0,15	0,05	0,05	0,15	0,05	0,15	0,05	0,05
T92+G+I	255	5647,716785	388,716866	-1680,014905	0,32962615	0,618378785	1,587692901	0,222059944	0,222059944	0,277940056	0,277940056	0,04	0,05	0,17	0,04	0,17	0,05	0,04	0,14	0,05	0,14	0,04	0,05
T92+G	254	5653,62504	389,911618	-1681,454693	n/a	0,299469239	1,390073186	0,222059944	0,222059944	0,277940056	0,277940056	0,05	0,06	0,16	0,05	0,16	0,06	0,05	0,13	0,06	0,13	0,05	0,06
TN93+G	257	5678,475297	390,4257968	-1686,42839	n/a	0,301593519	1,449500792	0,232283465	0,21836424	0,270947422	0,34493269	0,04	0,04	0,1	0,05	0,22	0,07	0,05	0,22	0,07	0,07	0,04	0,04
TN93+G+I	258	5683,793768	390,2742926	-1684,596444	0,197417353	0,388566733	1,407777349	0,323283465	0,21836424	0,270947422	0,34493269	0,04	0,04	0,11	0,05	0,21	0,07	0,05	0,21	0,07	0,07	0,04	0,04
GTR+G+I	261	5687,040224	388,5492714	-1672,76266	0,318575093	0,644192104	1,430997375	0,323283465	0,21836424	0,270947422	0,34493269	0,05	0,07	0,13	0,05	0,18	0,07	0,08	0,18	0,02	0,09	0,04	0,01
JC+G	252	5688,50593	394,8462245	-173,865291	n/a	0,28870437	0,5	0,25	0,25	0,25	0,25	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08
JC+G+I	253	5691,057442	394,4179777	-170,656555	0,34697056	0,761770135	0,5	0,25	0,25	0,25	0,25	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08
HKY+G+I	257	5693,089282	391,871953	-1693,729832	0,3990798	0,626554985	1,366907818	0,323283465	0,21836424	0,270947422	0,34493269	0,05	0,05	0,2	0,05	0,2	0,07	0,05	0,12	0,07	0,13	0,05	0,05
HKY+G	256	5699,939879	393,2556625	-1701,640791	n/a	0,290758042	1,285779387	0,323283465	0,21836424	0,270947422	0,34493269	0,05	0,05	0,19	0,05	0,12	0,08	0,05	0,12	0,08	0,13	0,05	0,05
GTR+G	260	5706,929831	397,213649	-1687,93124	n/a	0,340155642	1,013122747	0,323283465	0,21836424	0,270947422	0,34493269	0,04	0,08	0,12	0,05	0,15	0,06	0,09	0,15	0,08	0,08	0,04	0,05
K2+I	253	5919,508037	417,262572	-1824,879552	0,384072316	n/a	1,137197909	0,25	0,25	0,25	0,25	0,06	0,06	0,13	0,06	0,13	0,06	0,06	0,13	0,06	0,13	0,06	0,06
T92+I	254	5940,000423	418,6287	-1830,642384	0,383973124	n/a	1,158571692	0,222059944	0,222059944	0,277940056	0,277940056	0,05	0,06	0,15	0,05	0,15	0,06	0,05	0,12	0,06	0,12	0,05	0,06
JC+I	252	5963,87797	422,886622	-1851,552479	0,38933659	n/a	0,5	0,25	0,25	0,25	0,25	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08
TN93+I	257	5977,078156	420,286028	-1835,724269	0,383966835	n/a	1,107347998	0,323283465	0,21836424	0,270947422	0,34493269	0,05	0,05	0,14	0,05	0,14	0,08	0,05	0,14	0,08	0,1	0,05	0,05
HKY+I	256	5977,380266	420,9597012	-1840,360985	0,383963764	n/a	1,081559559	0,323283465	0,21836424	0,270947422	0,34493269	0,05	0,05	0,18	0,06	0,11	0,08	0,06	0,11	0,08	0,12	0,05	0,05
GTR+I	260	5984,390162	418,97398	-1825,92329	0,383775708	n/a	0,977791705	0,323283465	0,21836424	0,270947422	0,34493269	0,06	0,08	0,15	0,07	0,12	0,06	0,09	0,12	0,07	0,1	0,04	0,04
K2	252	6292,52536	4552,47108	-2015,869763	n/a	n/a	1,059392318	0,25	0,25	0,25	0,25	0,06	0,06	0,13	0,06	0,13	0,06	0,06	0,13	0,06	0,13	0,06	0,06
T92	253	6316,590328	4569,702663	-2023,47998	n/a	n/a	1,057275471	0,222059944	0,222059944	0,277940056	0,277940056	0,05	0,07	0,14	0,05	0,14	0,07	0,05	0,11	0,07	0,11	0,05	0,07
GTR	259	6322,08097	4534,14778	-1999,229555	n/a	n/a	0,86697459	0,323283465	0,21836424	0,270947422	0,34493269	0,06	0,08	0,13	0,07	0,12	0,08	0,08	0,12	0,08	0,09	0,05	0,05
TN93	256	6327,990293	4560,607038	-2015,665998	n/a	n/a	1,067821516	0,323283465	0,21836424	0,270947422	0,34493269	0,05	0,05	0,13	0,06	0,15	0,08	0,06	0,15	0,08	0,09	0,05	0,05
JC	251	6333,109655	4599,905084	-2040,653983	n/a	n/a	0,5	0,25	0,25	0,25	0,25	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08
HKY	255	6335,463427	4574,914808	-2023,888226	n/a	n/a	1,01043395	0,323283465	0,21836424	0,270947422	0,34493269	0,05	0,05	0,17	0,06	0,1	0,09	0,06	0,11	0,09	0,12	0,05	0,05

Tabla 3: Se considera que los modelos con las puntuaciones BIC más bajas (Criterio de Información Bayesiana) describen mejor el patrón de sustitución. Para cada modelo, también se presentan el valor AICc (criterio de información de Akaike, corregido), el valor de probabilidad máxima (lnL) y el número de parámetros (incluidas las longitudes de rama). La no uniformidad de las tasas de evolución entre los sitios puede modelarse utilizando una distribución Gamma discreta (+ G) con 5 categorías de tasas y suponiendo que una cierta fracción de los sitios es evolutivamente invariable (+ I). Siempre que sea aplicable, se muestran las estimaciones del parámetro de forma gamma y/o la fracción estimada de sitios invariantes. También se muestran los valores estimados o estimados del sesgo de transición/transversión (R) para cada modelo. Les siguen las frecuencias de nucleótidos (f) y las tasas de sustituciones de bases (r) para cada par de nucleótidos. Los valores relativos de r instantáneos deben considerarse al evaluarlos. Para simplificar, la suma de los valores de r se hace igual a 1 para cada modelo. Para estimar los valores de ML, se calculó automáticamente una topología de árbol. Este análisis involucró 127 secuencias de nucleótidos. Las posiciones de codón incluidas fueron 1st + 2nd + 3rd + Noncoding. Hubo un total de 62 posiciones en el conjunto de datos final. Los análisis evolutivos se realizaron en MEGA X [2].

Abreviaturas: TR: Tiempo general reversible; HKY: Hasegawa-Kishino-Yano; TN93: Tamura-Nei; T92: Tamura de 3 parámetros; K2: Kimura 2-parámetro; JC: Jukes-Cantor.

Impreso en Buenos Aires
en mayo, año 2019
Edición y encuadernación artesanal
Tinta al Tiempo
Piedras 482, 5º Q
info@tintaltiempo.com.ar



Tinta al tiempo