

UNIVERSIDAD DE PANAMÁ
VICERRECTORÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSTGRADO
PROGRAMA CENTROAMERICANO DE MAESTRÍA EN
ENTOMOLOGÍA

TRABAJO DE TESIS

“CONECTIVIDAD POBLACIONAL DEL MOSQUITO *Aedes albopictus* EN
LA CARRETERA PANAMERICANA: LA PERSPECTIVA DE
DISTRIBUCIÓN DE *Wolbachia* EN PANAMÁ”

POR

ALIETH Y. SÁNCHEZ F.

TESIS SOMETIDA PARA OPTAR POR EL TÍTULO DE MAESTRÍA EN
ENTOMOLOGÍA

PANAMÁ, REPÚBLICA DE PANAMÁ

2025

“CONECTIVIDAD POBLACIONAL DEL MOSQUITO *Aedes albopictus* EN
LA CARRETERA PANAMERICANA: LA PERSPECTIVA DE
DISTRIBUCIÓN DE *Wolbachia* EN PANAMÁ”

TESIS

Sometida para optar por el título de Magíster en Ciencias con énfasis en
Entomología

VICERRECTORÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSTGRADO

El permiso de esta publicación y reproducción parcial o total de este documento debe ser obtenido en el Vicerrectoría de Investigación y Postgrado.

APROBADO

_____ Asesor

_____ Jurado

_____ Jurado

DEDICATORIA

Quiero dedicar este trabajo de tesis con mucho orgullo a mi familia, mis padres: Manuel y María, hermanas: Amarilys, Mitzy y Maritza y sobrinas (o): Manuela, Liz Marie, Angela y Emanuel, quienes han estado presentes brindándome su apoyo, cariño incondicional y motivación para llevar a cabo este trabajo como parte de mi formación académica y crecimiento personal.

AGRADECIMIENTO

En primer lugar, doy gracias a Dios por sus bendiciones y por la oportunidad de poder continuar mi formación académica.

Extiendo profundamente mi agradecimiento a la Secretaría Nacional de Ciencia y Tecnología (SENACYT), por otorgarme la beca para mis estudios de maestría en el Programa Centroamericano de Maestría en Entomología de la Universidad de Panamá; es sin duda una invaluable oportunidad que me ha permitido lograr con éxito esta etapa de mi carrera profesional.

Manifiesto mi agradecimiento al Doctor José Loaiza, mi asesor de tesis quien ha sido un pilar muy importante a lo largo de la carrera; por sus enseñanzas, por las oportunidades y experiencia académicas brindadas, por ser guía excepcional para llevar a cabo este trabajo de tesis.

A mis coasesores: Doctor Julio Castillo y el Doctor Gilberto Eskildsen, por ser parte de este comité evaluador, por sus comentarios y observaciones en este trabajo de tesis.

Al Doctor Ari Whiteman, por apoyo en los análisis geoespaciales realizados en la tesis.

Agradezco al Instituto de Investigaciones Científicas y Servicios de Alta Tecnología (INDICASAT-AIP), ya este trabajo de tesis fue posible por el apoyo y el respaldo brindado en el Centro de Biodiversidad y Descubrimiento de Drogas, así como las enseñanzas en el campo de la Biología Molecular por parte de la Magister Mabelle Chong.

Quiero agradecer al Programa Centroamericano de Maestría en Entomología, a todos los profesores por contribuir en mi formación, a mis compañeros, a la Licenciada Viquelda Pérez por su apoyo y disposición en la parte administrativa.

A mi querida familia y amigos (Dilma, Abdiel y Naville) agradezco su comprensión y aliento que se convirtieron en esa fuerza impulsora para continuar a lo largo de todo este camino; donde logré ese crecimiento académico, profesional y personal.

ÍNDICE GENERAL

DEDICATORIA	3
AGRADECIMIENTO.....	4
ÍNDICE GENERAL.....	6
ÍNDICE DE TABLAS	8
ÍNDICE DE FIGURAS	9
ABREVIATURAS	10
RESUMEN	11
SUMMARY	13
1. INTRODUCCIÓN.....	14
OBJETIVOS	18
1.1. Objetivo general.....	18
1.2. Objetivo específicos.....	¡Error! Marcador no definido.
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	19
2.1 Biología y ecología de la dispersión de <i>Aedes albopictus</i>	19
2.1.1. Dispersión activa de <i>Aedes albopictus</i>	20
2.1.2. Dispersión pasiva <i>Aedes albopictus</i>	21
2.1.3. Expansión mundial de <i>Aedes albopictus</i>	23
2.2 Las bacterias del género <i>Wolbachia</i>	24
2.2.1 <i>Wolbachia</i> y los cambios que produce en sus huéspedes	26
2.2.2 <i>Wolbachia</i> y la competencia vectorial de <i>Aedes albopictus</i>	30
2.2.3 Tasa de infección y composición de cepas de <i>Wolbachia</i> en <i>Aedes albopictus</i>	32
3. METODOLOGÍA.....	34
3.1 Muestreo y técnicas de colecta de <i>Aedes albopictus</i>	34
3.1. Identificación taxonómica y extracción de ADN de las muestras colectadas	38

3.2.	Detección de <i>Wolbachia</i> en <i>Aedes albopictus</i>	38
3.3.	Clasificación de los supergrupos (A y B) de <i>Wolbachia</i> en <i>Aedes albopictus</i> 39	
3.4.	Técnica de separación de ADN y visualización de bandas de ADN	41
3.5.	Secuenciación <i>Wolbachia</i> en <i>Aedes albopictus</i>	42
3.6.	Análisis Filogenético de <i>Wolbachia</i> en <i>Aedes albopictus</i>	42
3.7.	Análisis estadístico para investigar la asociación entre la presencia de infecciones de <i>Wolbachia</i> en <i>Aedes albopictus</i> y las distancias desde las carreteras en Panamá.	43
4.	RESULTADOS	45
4.1.	Tasa global de infección por <i>Wolbachia</i> en <i>Aedes albopictus</i>	45
4.2.	Distribución de <i>Aedes albopictus</i> infectados con <i>Wolbachia</i> en Panamá.....	48
4.3.	Clasificación de los supergrupos A y B de <i>Wolbachia</i> en <i>Aedes albopictus</i>	51
4.4.	Secuenciación y análisis filogenético de las cepas de <i>Wolbachia</i> en <i>Aedes</i> <i>albopictus</i>	51
4.5.	Asociación entre la presencia o ausencia de <i>Aedes albopictus</i> infectados con <i>Wolbachia</i> y las características topográficas de Panamá.....	56
4.6.	Predicción de la probabilidad de infección con <i>Wolbachia</i> en <i>Ae. albopictus</i> asociado a las características topográficas de Panamá y la densidad de carretera..	58
5.	DISCUSIÓN	60
6.	CONCLUSIONES	68
7.	RECOMENDACIONES	69
8.	REFERENCIA BIBLIOGRAFICA	70

ÍNDICE DE TABLAS

Cuadro 1. Detección de <i>Wolbachia</i> en especímenes de <i>Aedes albopictus</i> colectados en diferentes regiones del mundo.	34
Cuadro 2. Transinfecciones de diferentes cepas de <i>Wolbachia</i> en <i>Aedes albopictus</i> en condiciones de campo/laboratorio en diferentes regiones del mundo.	35
Cuadro 3. Detección de <i>Wolbachia</i> en <i>Ae. albopictus</i> de Panamá por tipo de local y ubicación geográfica, mediante amplificación por PCR de los genes <i>wsp</i> (PCR-1) y 16S (PCR-2) y tipificación de genotipos de <i>Wolbachia</i> utilizando marcadores específicos del gen <i>wsp</i> (PCR-3).	54
Cuadro 4. Modelo de distribución binomial (Regresión Logística) utilizando la distancia directa a la autopista.	61
Cuadro 5. Modelo de distribución binomial (Regresión Logística) utilizando la distancia por la carretera a la autopista.	62
Cuadro 6. Tasa de infección de <i>Wolbachia</i> , en línea recta a la autopista y la distancia por carretera a la autopista.	63

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Mapa global de la distribución prevista de <i>Aedes albopictus</i> . El mapa representa la probabilidad de ocurrencia (de 0 azul a 1 rojo). (Kraeme et al., 2015)	23
Figura 2. Detección de <i>Wolbachia</i> (azul) en órganos reproductivos (ovarios) y tejidos somáticos (glándulas salivares, Túbulos de Malpighi y cuerpo graso). Adaptado de Walker et al., 2011.	25
Figura 3. Filogenia de <i>Wolbachia</i> . a) Representación esquemática de las relaciones filogenéticas entre supergrupos de <i>Wolbachia</i> dentro de la familia Anaplasmatacea. b) Posiciones filogenéticas de los subgrupos (A-F, H-Q y S) de <i>Wolbachia</i> en base a genes único multilocus. Adaptado de Kaur et al., 2021.	26
Figura 4. A. Compatibilidad entre cruces e incompatibilidad citoplasmática en mosquitos. a) un cruzamiento incompatible ocurre cuando los machos infectados con <i>Wolbachia</i> se cruzan con hembras libre de <i>Wolbachia</i> . El rescate ocurre cuando la hembra está infectada b. ejemplo de resultados de cruces cuando el macho y la hembra tienen diferentes tipos de infecciones (Kaur et al., 2021).	27
Figura 5. Sitios de muestreo seleccionados en ocho provincias de la República de Panamá. Se muestra la localización de los talleres (azul) y casas (amarillo) muestreadas. Mapa extraído de Google Earth.	36
Figura 6. Taller mecánico revendedor de neumático usados. Ubicación: provincia de Coclé.	36
Figura 7. Características morfológicas para la identificación de las larvas y adultos de <i>Ae. albopictus</i> . A. Escudo tóraxico mostrando franja de escamas blancas en posición media longitudinal. B. Cepillo ventral con 4 pares de setas simples. C. Escamas del peine sin espinas subapicales.	37
Figura 8. Preparación de las reacciones de PCR y electroforesis en gel.	40
Figura 9. Visualización de fragmentos amplificados mediante PCR en muestras de <i>Aedes albopictus</i>	41
Figura 10. Secuencias del gen <i>wsp</i> de <i>Wolbachia</i> para Panamá (WA HWY CH 56, WB1 HWY CH 56, WB1 HWY CH 56) y otras regiones del mundo (wAlb-AF020058, wAlb-AF020059 y Wpip-AF020060).	53
Figura 11. Árbol filogenético reconstruido mediante el método de neighbor-joining (NJ) o vecino cercano basado en las secuencias del gen <i>wsp</i> de <i>Wolbachia</i> de <i>Ae. albopictus</i> colectados a lo largo de la República de Panamá. La cepa wAlbA se distingue con un círculo; con un cuadrado la cepa wAlbB y con un triángulo la cepa wPip. Las muestras colectadas se marcan en casa y aquellas colectadas en talleres en gris. El grupo externo corresponde a la secuencia de <i>wsp</i> de la cepa de <i>Wolbachia</i> de la filaria <i>Brugia palanghi</i> , obtenida de GenBank. El nombre de cada muestra consiste de las iniciales de la provincia, localidad y número de secuencia; el asterisco representa doble infección para esa muestra. Los valores en cada nodo corresponden al valor de arranque (Bootstrap de 1000 repeticiones). La barra representa la distancia genética.	55

ABREVIATURAS

ADN: ácido desoxirribonucleico

ARNr 16S: Ácido ribonucleico ribosomal 16 S

CHIKV: Virus Chikungunya

DENV (1-2-3-4): Virus dengue (Serotipo 1, 2, 3 y 4)

GENBANK: Banco de genes

MEGA: Molecular Evolutionary Genetic Analysis

NCBI: National Center for Biotechnology Information

NJ: Neighborjoining (Vecinos cercanos)

PCR: Polymerase chain reaction (Reacción de la cadena de la polimerasa)

WSP: gen de la proteína de la superficie en *Wolbachia*

ZIKV: Virus Zika

RESUMEN

Aedes albopictus o mosquito tigre asiático es un vector eficiente de arbovirus causantes de enfermedades en los seres humanos con un gran impacto en la salud pública mundial. Esta especie ha expandido su rango de distribución gracias al transporte asistido por el hombre a través de diferentes vías de transporte aéreo, marítimo, y terrestre. Los múltiples eventos de introducción de *Ae. albopictus* en diferentes áreas geográficas del mundo han resultado en su adaptación y establecimiento en diferentes entornos, favoreciendo su supervivencia. *Ae. albopictus* llegó a Panamá en 2002, y tuvo un gran éxito de expansión desde su introducción inicial. Este estudio tiene como propósito determinar la conectividad poblacional de *Ae. albopictus* por medio de la detección y caracterización de cepas de la bacteria endosimbionte *Wolbachia* en mosquitos colectados en distintas regiones del país. El trabajo intenta establecer una relación entre la probabilidad de infección por *Wolbachia* en distintas poblaciones de *Ae. albopictus* y algunas características topográficas del paisaje, incluyendo las principales rutas de transporte terrestre. Para lograr estos objetivos se colectaron 661 individuos de *Ae. albopictus* (Huevos, larvas, y/o adultos) en talleres para la compra y venta de neumáticos usados y en viviendas distribuidas a lo largo de las

principales carreteras y sitios urbanos de Panamá. Por medio de la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y marcadores moleculares específicos (wsp/ARNr 16 S) se determinó una tasa de infección por *Wolbachia* en *Ae. albopictus* menor al 30%. Mientras que por secuenciación Sanger detectamos la presencia de tres cepas de *Wolbachia* (wAlbA/wAlbB/wPip) ampliamente distribuidas en el país. Finalmente, nuestros resultados indican que existe una tendencia a la disminución de las infecciones por *Wolbachia* en función de la distancia entre el punto de colecta del mosquito y las principales carreteras de Panamá.

SUMMARY

Aedes albopictus, or the Asian tiger mosquito, is an efficient vector of arboviruses that cause human diseases and have a significant impact on global public health. This species has expanded its range thanks to human-assisted transport through various air, sea, and land routes. The multiple introductions of *Ae. albopictus* to different geographic areas around the world have resulted in its adaptation and establishment in different environments, favoring its survival. *Ae. albopictus* arrived in Panama in 2002 and has enjoyed significant expansion since its initial introduction. This study aims to determine the population connectivity of *Ae. albopictus* by detecting and characterizing strains of the endosymbiotic bacterium *Wolbachia* in mosquitoes collected from different regions of the country. This work attempts to establish a relationship between the probability of *Wolbachia* infection in different populations of *Ae. albopictus* and some topographical features of the landscape, including major land transport routes. To achieve these objectives, 661 *Ae. albopictus* individuals (eggs, larvae, and/or adults) were collected from used tire shops and homes located along major highways and in urban areas of Panama. Using polymerase chain reaction (PCR) and specific molecular markers (*wsp*/16S rRNA), we determined a *Wolbachia* infection rate in *Ae. albopictus* of less than 30%. Sanger sequencing revealed the presence of three *Wolbachia* strains (*wAlbA*/*wAlbB*/*wPip*) widely distributed in the country. Finally, our results indicate a downward trend in *Wolbachia* infections with the distance between the mosquito collection site and major highways in Panama.

1. INTRODUCCIÓN

El mosquito *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Skuse) (1895), conocido también como mosquito tigre asiático (Reinert et al., 2009), es un transmisor de enfermedades causadas por virus como dengue, Chikungunya, Zika y fiebre amarilla, las cuales impactan negativamente la salud pública mundial (Patterson, 2016). Se estima que el 86% de los países del mundo son susceptibles a la invasión y adaptabilidad de esta especie de mosquito, así como también a la transmisión de los virus que porta (Birungi & Munstermann, 2002; Leta et al., 2018).

Aedes albopictus es originario del Sudeste Asiático, sin embargo, ha logrado adaptarse a regiones tropicales y templadas garantizando su expansión demográfica mundial. Los primeros reportes de invasión por *Ae. albopictus* ocurrieron en Pacífico Occidental y en la India. Posteriormente, este vector invadió África, Oriente Medio, Europa y América (Mogi et al., 2015). Los adultos de *Ae. albopictus* tienen una capacidad de vuelo limitada desde los sitios de cría; no obstante su expansión mundial exitosa se debe a que sus huevos han desarrollado la capacidad de resistir la desecación en periodos prolongados de sequia, lo que ha facilitado su transporte en recipientes artificiales mediante diferentes vías de dispersión como el transporte marítimo, aéreo, y terrestre transporte vehicular (Swan et al., 2022).

Los múltiples eventos de introducción de *Ae. albopictus* procedente de los diferentes destinos continentales e intercontinentales han conllevado a cambios en su distribución geográfica inicial, aumentando la posibilidad de interacción ecológica con otras especies residentes dentro del género *Aedes* (Kotsakiozi et al., 2017; Manni et al., 2017; Sherpa et al., 2017).

El mosquito *Ae. albopictus* se encuentra naturalmente infectado por dos cepas de la bacteria *Wolbachia* (wAlbA y wAlbB), y por lo tanto, su dispersión espacial podría en principio facilitar la dispersión de estas bacterias (Rodríguez, 2013; Goubert et al., 2016; Kulkarni et al., 2019). Por otro lado, este mosquito ha sido transinfectado con otras cepas de *Wolbachia* como estrategia para el control de las enfermedades que transmite (Cuadro 2). La bacteria *Wolbachia* tiene la capacidad de modificar fenotipos reproductivos y de aumentar la supervivencia de su hospedador influyendo en la dinámica poblacional y la distribución espacial. Además, algunas cepas de *Wolbachia* pueden reducir la tasa de replicación de virus en su hospedero, entre ellos, el dengue (DENV), Chikungunya (CHIKV) y Zika (ZIKV) (Tram & Sullivan, 2002; Werren et al., 2008; Kulkarni et al., 2019).

En Panamá, *Ae. albopictus* se reportó por primera vez en el corregimiento de la 24 de Diciembre, provincia de Panamá, en el año 2002. Este mosquito logró expandirse en menos de diez años en gran parte del territorio nacional, asociado con el trasiego de llantas usadas por las principales redes de transporte a nivel nacional (Miller & Loaiza, 2015; Bennett et al., 2019). Esta actividad sugiere que existe una elevada conectividad poblacional en este vector; lo cual pudiese estar relacionado con la presencia y amplia distribución de cepas de bacterias del género *Wolbachia* en la República de Panamá. En este sentido, el presente trabajo propone investigar la conectividad poblacional de *Ae. albopictus* utilizando como perspectiva a la *Wolbachia* para conocer su dinámica de dispersión espacial en Panamá.

Si la conectividad poblacional de *Ae. albopictus* es elevada debido al movimiento pasivo de neumáticos que favorece su dispersión podríamos considerar que la distribución espacial de cepas comensales de *Wolbachia* sería también ampliamente dispersada. Por el contrario, si la conectividad poblacional de *Ae. albopictus* es baja, entonces distintas cepas de *Wolbachia* se encontrarían más restringidas geográficamente en el país. Además de esto, esperaríamos que los mosquitos encontrados en sitios cercanos a las principales carreteras pudiesen tener una mayor probabilidad de infección

con cepas de *Wolbachia*, en comparación con aquellos colectados en sitios distantes de la carretera.

Esta información es importante para las estrategias de mitigación y control de los mosquitos *Aedes*, indicando cuales serían los puntos de liberación y la frecuencia de dispersión del *Aedes* con *Wolbachia*.

OBJETIVOS

1.1. Objetivo general

Determinar la composición y distribución de las bacterias *Wolbachia* presentes en poblaciones del mosquito *Aedes albopictus* en Panamá.

1.2. Objetivos específicos

- Detectar e identificar la presencia de bacterias del Género *Wolbachia* en mosquitos de la especie *Aedes albopictus* colectados en viviendas y talleres para la compra y venta de neumáticos usados en la carretera panamericana.
- Investigar la relación que existe entre los puntos de colecta de los mosquitos infectados con *Wolbachia* y la distancia geográfica desde las principales carreteras de Panamá.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 Biología y ecología de la dispersión de *Aedes albopictus*

Aedes albopictus mide aproximadamente de 2 a 10 mm, posee un patrón de escamas negras y blancas en el cuerpo y la presencia de una hilera blanca en el área media longitudinal del mesonoto. El ciclo de vida involucra varias etapas (huevo, larva, pupa y adulto) en un periodo de 7 a 14 días bajo condiciones de clima óptimas (26 a 28°C). Los huevos suelen ser ovalados de color negro de unos 0,5 mm de longitud, y son ovipositados de forma individual en las paredes de los criaderos sobre el nivel del agua. El estado de larva involucra cuatro estadios de crecimiento continuo; los cuales varían en tamaño; por ejemplo, las larvas de cuarto estadio se convierten en pupa experimentando cambios fisiológicos y morfológicos para convertirse en el mosquito adulto (Anoopkumar et al., 2017; Rios & Maruniak, 2004).

A nivel mundial, *Ae. albopictus* se encuentran en regiones tropicales y templadas; condiciones que han llevado a esta especie a desarrollar una alta capacidad de adaptación a cambios ambientales para garantizar su supervivencia en el entorno (Huey, 1979). Este mosquito se encuentra asociado tanto con zonas rurales, urbanas y suburbanas, así como también posee acceso a una gran diversidad de huéspedes como: mamíferos, reptiles,

aves, anfibios, ser humano. Así como una gran cantidad y variabilidad de criaderos tanto naturales como artificiales; factores clave para la expansión mundial, debido a que los huevos son resistentes a la desecación; es decir, sobreviven en la ausencia de agua por un periodo de tiempo de hasta un año aproximado (Sanders et al., 2020).

2.1.1. Dispersión activa de *Aedes albopictus*

La dispersión activa del mosquito es su capacidad de desplazamiento desde el sitio de cría hacia otros sitios que le garantizan los recursos tales como alimentación, apareamiento, sitios de oviposición y lugares de reposo (Service & Place, 1997). Esta dispersión está relacionada con la fisiología de los mosquitos, las condiciones ambientales y las barreras físicas como cuerpos de agua y las estructuras urbanas (Verdonschot & Besse-lototskaya, 2014).

Las distancias de dispersión activa del mosquito *Ae. albopictus* se han investigado utilizando diferentes técnicas, entre ellas, la captura, marcaje, liberación y recaptura (MRR), uso de polvos y pigmento fluorescente y Rubidio (Rb). Los resultados de estos trabajos evidencian que las distancias de vuelo desde el lugar donde emerge el adulto son reducidas (< 100 m). Aunque, algunos estudios describen que *Ae. albopictus* puede llegar a

desplazarse distancias de hasta 800 metros (Harrington et al., 2005; Honório et al., 2003; Lacroix et al., 2009; Vavassori et al., 2019). En cuanto a la dispersión vertical puede llegar a volar más de 50 metros de altura (C. Liew & C.F.Curtis, 2004), con preferencia por lugares cerca del suelo y a pocos metros del suelo (Jin et al., 2023).

2.1.2. Dispersión pasiva *Aedes albopictus*

La dispersión pasiva del mosquito es el movimiento involuntario asistido por el ser humano, como el transporte de mercancía por medio de diferentes vías de dispersión. A partir de los primeros reportes de invasión del mosquito *Ae. albopictus* desde 1940 hasta el 2020, esta especie se expandió en 86 nuevos países. El transporte marítimo ha sido la principal vía de dispersión a escala global y continental. Esta vía ha sido la más antigua para la propagación de *Ae. albopictus*, con reportes que datan desde 1944 en la región del Pacífico Occidental en Guam, durante este periodo surge la confrontación bélica de la Segunda Guerra mundial (Hull, 1958), conflicto que propicio gran movilidad humana y de mercancía. Hoy día el transporte marítimo sigue siendo considerado como una de las principales rutas para la comercialización de neumáticos usados, siendo este un medio eficaz de dispersión de *Ae. albopictus* (Roiz et al., 2007).

Otra fuerza que ha impulsado la propagación de *Ae. albopictus* a una escala intercontinental y nacional es el transporte vehicular y el comercio de neumáticos usados via terrestre (Swan et al., 2022; Trájer et al., 2017). Además de la dispersión asistida por los seres humanos, otros factores ambientales han incidido en el éxito de supervivencia de este mosquito (Eritja et al., 2017). Evidencias de la dispersión de *Ae. albopictus* por rutas terrestres se han reportado en Europa, por ejemplo: en Montenegro en 2001, Grecia en 2003, Suiza en 2003, Croacia en 2004, Bosnia y Herzegovina en 2005, Mónaco en 2006, Alemania en 2007, Eslovenia en 2007 y San Marino-Italia en 2007.

Por otro lado, el transporte aéreo es otro medio de dispersión de *Ae. albopictus* hacia múltiples destinos geográficos en periodos cortos de tiempo. Un estudio realizado por Scholte (2014) donde realizaron inspecciones en 38 cabinas de aviones comerciales durante 14 meses determinó la presencia de mosquitos en 10 de ellas. Igualmente, entre 2016 y 2018, Ib y colaboradores realizaron otro estudio en aeropuertos ubicados en Bélgica, Reino Unido y Países Bajos donde se identificaron diferentes especies de mosquitos incluyendo al *Ae. aegypti* y *Ae. albopictus* (Ib et al. 2020).

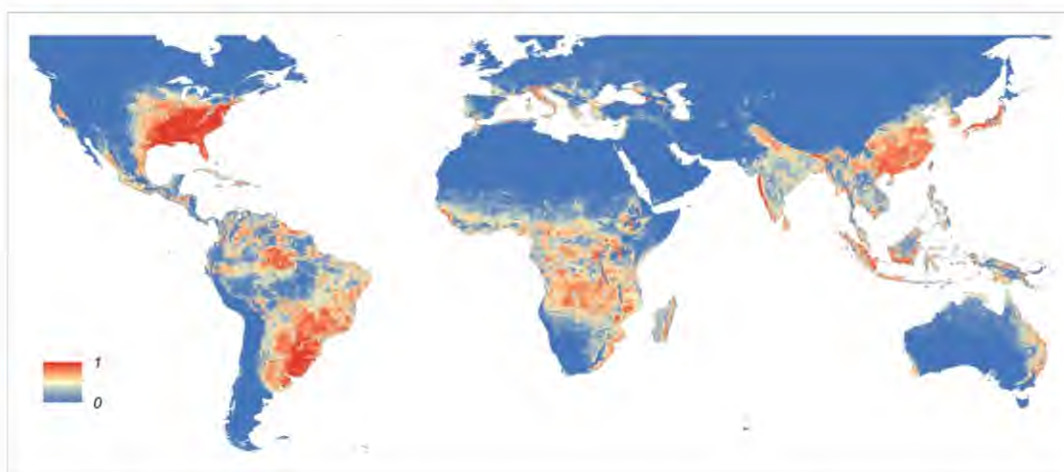


Figura 1. Mapa global de la distribución prevista de *Aedes albopictus*. El mapa representa la probabilidad de ocurrencia (de 0 azul a 1 rojo). (Kraeme et al., 2015)

2.1.3. Expansión mundial de *Aedes albopictus*

Como hemos mencionado anteriormente, *Ae. albopictus* se desplaza espacialmente tanto por medio de mecanismos activos así como también por mecanismos pasivos de dispersión (Moo-llanes et al., 2021). El mosquito *Ae. albopictus* fue introducido en los Estados Unidos de América potencialmente desde las Filipinas en 1946, mientras que se estima que Brasil fue invadido desde Asia 40 años después. África del Sur fue invadido por *Ae. albopictus* desde Japón aproximadamente en 1989, mientras que Albania-Europa fueron invadidas desde China en 1989, Italia en 1990, Francia en 1999 y Bélgica en 2000 desde los Estados Unidos y Japón (Swan et al., 2022).

La expansión mundial de *Ae. albopictus* ha tenido un impacto significativo en la variabilidad genética de sus poblaciones. Por ejemplo, en América y África se han reportado más de 20 haplotipos con genes mitocondriales y nucleares, alguno de los cuales se han asociado a un mayor riesgo de transmisión de enfermedades. De igual manera, los organismos endosimbiontes de este mosquito, como algunas cepas de bacterias del género *Wolbachia* pudiesen haberse dispersado con su hospedero, sin embargo, muy poco se sabe sobre la dispersión de estas bacterias en entornos naturales.

2.2 Las bacterias del género *Wolbachia*

Las bacterias gram-negativas del género *Wolbachia* fueron descritas por primera vez en la especie de mosquito *Culex pipiens*; esta bacteria se encuentran en alrededor del 40% de los artrópodos descritos y también en algunos nemátodos (Zug & Hammerstein, 2012). Las bacterias del género *Wolbachia* son endosimbiontes intracelulares, es decir viven dentro de las células de sus huéspedes, y se caracterizan por tener un amplio tropismo en tejidos somáticos, entre ellos, cerebro, músculos, intestino, glándulas salivares, túbulos de Malpighi, cuerpo graso, alas y hemolinfa. Sin embargo, estas bacterias se encuentran principalmente en los tejidos reproductivos de

su hospedero, principalmente en los ovarios de las hembras (Figura 2) (Dobson et al., 1999; Bian et al., 2010).

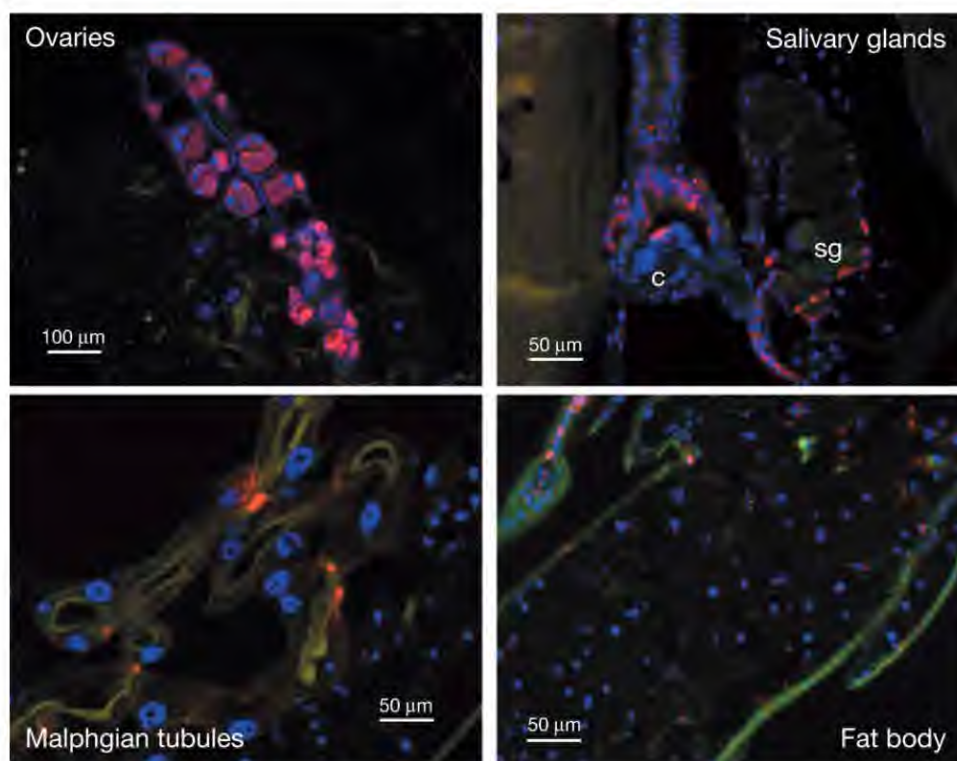


Figura 2. Detección de *Wolbachia* (azul) en órganos reproductivos (ovarios) y tejidos somáticos (glándulas salivares, Túbulos de Malpighi y cuerpo graso). Adaptado de Walker et al., 2011.

Basados en el sistema de clasificación de inferencia filogenética de secuencias del gen de la proteína de la superficie de *Wolbachia* (*wsp*) y del gen ARNr 16S se describieron ocho grupos de *Wolbachia* (A -H). Posteriormente se planteó una segunda clasificación basándose en un sistema de tipificación de secuencias multilocus (MLST) describiendo 17 posibles subgrupos filogenéticos denominados (subgrupos A-F, H-Q y S); (Figura 3) (Zhou et al.,

1998; Baldo et al., 2006; Werren et al., 2008). En la actualidad se ha logrado secuenciar el genoma de distintas cepas pertenecientes a diferentes subgrupos de *Wolbachia*, como, por ejemplo: wMel de *Drosophila melanogaster*; wBm de *Brugia malayi*; wPip de *Culex pipiens* y wAlbA/wAlbB de *Ae. albopictus* (Kaur et al., 2021).

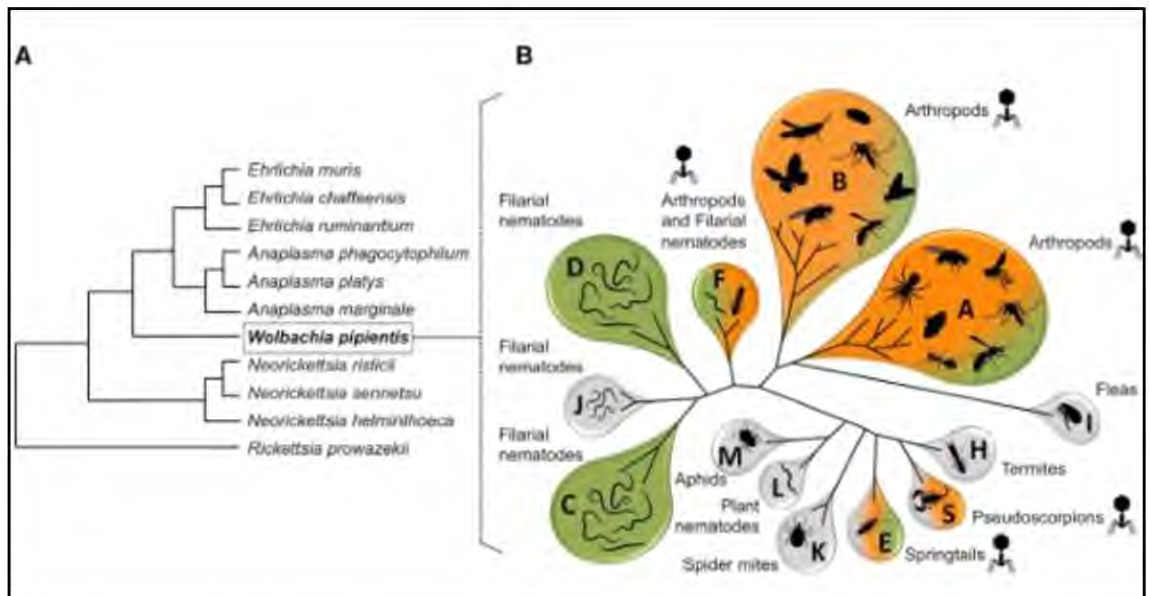
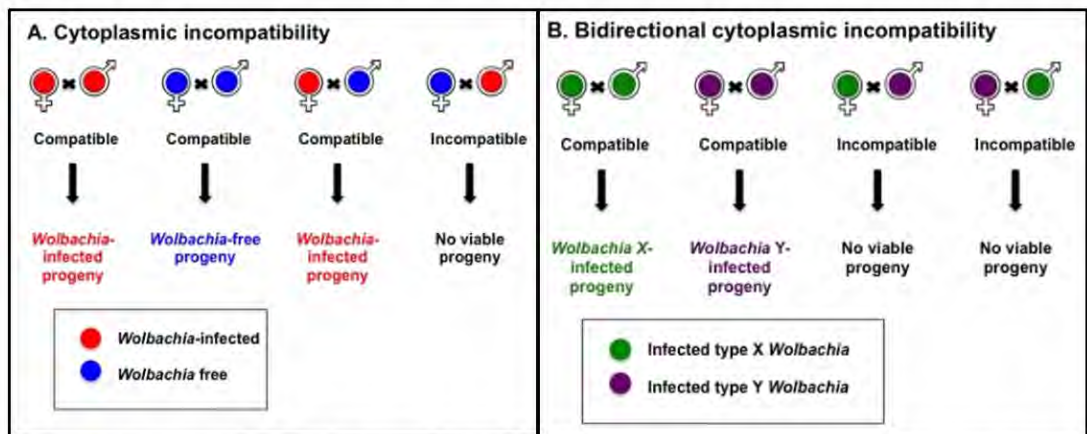


Figura 3. Filogenia de *Wolbachia*. a) Representación esquemática de las relaciones filogenéticas entre supergrupos de *Wolbachia* dentro de la familia Anaplasmataceae. b) Posiciones filogenéticas de los subgrupos (A-F, H-Q y S) de *Wolbachia* en base a genes único multilocus. Adaptado de Kaur et al., 2021.

2.2.1 *Wolbachia* y los cambios que produce en sus huéspedes

La bacteria *Wolbachia* es capaz de causar cambios en la biología de sus huéspedes, modificando el fenotipo reproductivo y favoreciendo de manera

selectiva a las hembras infectadas garantizando la transmisión materna o transferencia vertical a toda su descendencia para su propagación y establecimiento en los diferentes huéspedes (Rodríguez, 2013; Porter & Sullivan, 2023). Estos cambios ocurren a través de diferentes mecanismos biológicos como la incompatibilidad citoplasmática (IC), la partenogénesis, la matanza de machos y la feminización. La IC causa la muerte de los embriones cuando los machos infectados con *Wolbachia* se aparean con hembras no infectadas, esto produce cambios en la condensación de cromatina del cigoto y falta de sincronía mitótica entre los cromosomas de los machos (Tram y Sullivan, 2002). Por otro lado, cuando las hembras están



infectadas con *Wolbachia* y el macho no posee la bacteria la descendencia sobrevive (ocurre un rescate).

Figura 4. A. Compatibilidad entre cruces e incompatibilidad citoplasmática en mosquitos. a) un cruzamiento incompatible ocurre cuando los machos infectados con *Wolbachia* se cruzan con hembras libre de *Wolbachia*. El rescate ocurre cuando la hembra está infectada b. ejemplo de resultados de cruces

cuando el macho y la hembra tienen diferentes tipos de infecciones (Kaur et al., 2021).

Tanto la IC y el rescate están regulados por los genes *cifA* y *cifB*, que se encuentran en el profago WO que está integrado en el genoma de *Wolbachia* de algunos subgrupos (Metcalf et al., 2017; Kulkarni et al., 2019; Dobson et al., 2009).

Otro mecanismo biológico usado por *Wolbachia* para influir en la reproducción su hospedero es la matanza de macho o *Male-killing*, cuando se expresa el gen (*wnk*) provocando la letalidad durante la embriogénesis, lo que conlleva a la producción de una mayor proporción de hembras versus machos por generación (Hurst et al., 2000). De igual manera, *Wolbachia* puede inducir la feminización de los machos, produciendo un cambio en el cromosoma sexual, que resulta también en la mayor producción de hembras por generación (Rigaud & Juchault, 1992). Por otro lado, *Wolbachia* también puede alterar la proporción del sexo a través de mecanismos de partenogénesis que no dependen del apareamiento o reproducción sexual (Stouthamerff & Kazmert, 1994).

Como parte de las estrategias de control de enfermedades arbovirales transmitidas por *Ae. albopictus* se ha propuesto el uso de la bacteria *Wolbachia*

para reducir las poblaciones naturales de este vector y/o para reemplazar aquellas poblaciones naturales con otras que poseen menor capacidad de transmisión de virus a los seres humanos. El objetivo de este enfoque busca la supresión o reducción de poblaciones de *Ae. albopictus*; aprovechando el papel de *Wolbachia* ante infecciones virales como: DENK, CHIKV y ZIKV, además de la modificación del fenotipo reproductivo. Para lograrlo se transinfectan cepas no nativas de *Wolbachia* en *Ae. albopictus* (Caputo et al., 2019) (Cuadro 2).

Las densidades de *Wolbachia* en el insecto hospedero dependen de varios factores como: el tipo de cepa que infecta al huésped (Pan et al., 2018), la respuesta del sistema inmune a agentes virales por parte del huésped (Tortosa et al. 2008). Además, los cambios ambientales como la temperatura están directamente asociados con las densidades de *Wolbachia* en poblaciones naturales de su hospedero (Ye et al., 2016). La temperatura, por ejemplo, juega un papel en el establecimiento de cepas como la *wMel* principalmente en climas templados y áridos donde hay mayor variabilidad de temperatura durante el verano en comparación regiones tropicales (Hien et al., 2022).

2.2.2 *Wolbachia* y la competencia vectorial de *Aedes albopictus*

Se ha demostrado que las cepas nativas de *Wolbachia* en *Ae. albopictus* no afectan la replicación de DENV en el mesenteron, sin embargo, estas pueden reducir la infección viral en las glándulas salivares y limitar la transmisión viral (Mousson et al., 2012). Al eliminar las infecciones nativas de *Wolbachia* (wAlbA y wAlbB) en *Ae. albopictus* infectado con DENV, se demostró una disminución en la tasa de supervivencia, pero no se redujo la capacidad del mosquito de ser infectado (susceptibilidad), ni del virus de ser propagado dentro del organismo (diseminación). No obstante, si ocurrió un aumento la replicación del material genético intracelular (replicación viral) (Joanne et al., 2017; Tsai et al., 2017). Cuando se eliminan las cepas nativas de *Wolbachia* presentes en *Ae. albopictus* y se transinfecta el mosquito con cepas no nativa (por ejemplo, wMel), esto proporciona un fuerte bloqueo o inhibición del viral, lo que sugiere que el tipo de cepa presente en el huésped influye en las estrategias de reemplazo de la población (Blagrove et al., 2012). En términos de evolución, *Wolbachia* es capaz de bloquear la transmisión de DENV, por lo que resulta de mucho éxito como estrategia de control, siempre y cuando el bloqueo no sea superado en el tiempo (Britton, 2013; Bull & Turelli, 2013).

Las cepas de *Wolbachia* que infectan naturalmente al mosquito *Ae. albopictus* (wAlbA y wAlbB) no tienen efecto sobre la susceptibilidad del vector al virus

Chikungunya. Además, estas cepas tampoco afectan la replicación viral en el vector, aunque sí poseen un efecto mínimo sobre la diseminación del virus en las glándulas salivares (Ahmad et al., 2017). Las cepas de *Wolbachia* wAlbA y wAlbB pueden disminuir la densidad de la *Wolbachia* trans-infectada al competir por recurso y espacio en los tejidos del mosquito (Lyon, 2010) (Failloux & Weill, 2008). Aunque en ausencia de las cepas nativas y en presencia de otra cepa como wMel, pueden ocurrir varios procesos celulares metabólicos afectando la replicación viral de CHIKV (Saucereau et al., 2017).

En cuanto al virus ZIKV, trabajos anteriores señalan que la triple infección de *Ae. albopictus* con wAlbA, wAlbB y wMel bloquea su replicación casi por completo en los tejidos del huésped. No obstante, el efecto de inhibición de la replicación viral es incluso mayor en ausencia de cepas nativas (Guo et al., 2022). La transfección de la cepa wStri en *Ae. albopictus* demostró ser muy eficaz al inhibir la replicación de ZIKV, lo cual estuvo asociado a una reducción significativa de la entrada del virus en las células (Schultz et al., 2017). De igual manera, alteraciones en el metabolismo del colesterol dentro de las células huéspedes, parecen disminuir la eficacia con la que se replica ZIKV en *Ae. albopictus* (Edwards et al., 2023).

2.2..3 Tasa de infección y composición de cepas de Wolbachia en *Aedes albopictus*

Ae. albopictus se encuentra infectado naturalmente por las cepas wAlbA del supergrupo A y wAlbB del supergrupo B. En la mayoría de los estudios realizados a la fecha, existe una gran proporción de individuos de *Ae. albopictus* infectados con ambas cepas (wAlbA/wAlbB). Sin embargo, las infecciones únicas con wAlbB representan menos del 10% y aquellas con wAlbA incluso menos del 3% (Tabla 1).

Tabla 1. Detección de *Wolbachia* en especímenes de *Aedes albopictus* colectados en diferentes regiones del mundo.

País	Número de mosquitos	Métodos /marcadores	% Infección	Supergrupos de <i>Wolbachia</i>			Referencias
				AB	A	B	
Malasia	286 adultos	PCR(wsp)	80.00 %	91.60 %	1.05 %	2.05 %	Joanne et al., 2015
Malasia	104 adultos	PCR(wsp)	100.00 %	70.19 %	0.00 %	29.81 %	Afizah et al., 2015
Malasia	284 larvas	PCR(wsp)	25.00 %	-	-	-	Kim et al., 2017
China	693 adultos	PCR(16S/ wsp/ MLST)	93.36 %	80.95 %	2.31 %	10.10 %	Hu et al., 2020
Hong Kong	1582 adultos	PCR (wsp)	80.00 %	36.80 %	23.00 %	24.00 %	Huang et al., 2020
Corea del Sur	341 adultos	RT-PCR (16 S/ wsp/ MLST)	97.10 %	-	-	-	Park et al., 2016
Tailandia	320 adultos	PCR(wsp)	97.5 %		0.94 %	1.56%	Kittayapong et al., 2002
India	48 adultos	PCR anidada/secuenciación	85.00 %	-	-	100.00 %	Vinayagam et al., 2023
India	596 adultos	PCR (wsp*)	87.30 %	78.60 %	-	8.70 %	Mohanty et al., 2021
India	1291 adultos	PCR (wsp)	96.80 %	-	-	-	Das et al., 2014
Grecia	105 adultos	PCR / Sanger	90.00 % ♂ 97.00% ♀	84.00%	---	16.00 %	Misailidis et al., 2024
España	55 adultos	PCR (wsp/ ARN 16 S)	94%	72.30 %	-.	-	Ruben et al., 2023
Viejo mundo USA (NJ, TX, FL, HI), Brazil	S/d poblaciones	PCR (wsp*)	100.00 %	-	-	-	Armbruster et al., 2003
México	45 adultos	PCR (wsp)	40.00%	-	-	-	Puerta-Guardo et al., 2020
Brasil	150 adultos	PCR (wsp)	91.61%	98.82%			Albuquerque et al., 2011
Colombia	400 adulto	PCR (wsp)	38.95 %				Duque-Granda et al., 2022
Panamá	11 pool		15.00 %	-	-	-	Gómez-Martínez, et al., 2019
Argentina	26 adultos	PCR (wsp)	80.77 %	-	-	42.00%	Chuchuy et al., 2018
Argentina	312 larvas	PCR	76.89 %	52.80%	0.25%	23.84	Alonso et al., 2022

Tabla 2. Transinfecciones de diferentes cepas de *Wolbachia* en *Aedes albopictus* en condiciones de campo y/o laboratorio en diferentes regiones del mundo.

País	Condiciones		Cepas	Huésped nativo	Fenotipo que produce	Referencias
	Campo	Laboratorio				
Australia/UK		X	wMel	<i>D. melanogaster</i>	Inhibidor viral de DENV y CHIKV	Voronin et al., 2010
Francia		X			IC bidireccional completa	Blagrove et al., 2012
UK		X			IC	Ant & Sinkins, 2018
Malasia		X	wAu	<i>D. simulans</i>	Inhibidor viral de DENV y ZIKV	Mancini et al., 2020
China		X	wTtru	<i>T. truncatus</i>	Estrecha relación con la cepa wAlbB	Xia., 2018
Japón		X	wRi	<i>D. simulans</i>	IC unidireccional y alta tasa de transmisión materna	Fu et al., 2010
Estado Unidos	X		wPip	<i>C. pipiens</i>	Reducción en la eclosión y en el número de hembras	Mains et al., 2016
Italia	X		ARwP (línea sin infección natural) + wPip		Reducción en la fertilidad de las hembras y en la tasa de eclosión de huevos.	Caputo et al., 2019

3. METODOLOGÍA

3.1 Muestreo y técnicas de colecta de *Aedes albopictus*

El muestreo de mosquitos se llevó a cabo entre 2015 y 2017. Los mosquitos fueron colectados en 16 talleres dedicados a la compraventa de neumáticos usados ubicados en las provincias de Chiriquí, Veraguas, Herrera, Coclé, Panamá Oeste y Panamá. Se muestrearon además 15 casas en ocho provincias: Chiriquí, Veraguas, Herrera, Los Santos, Coclé, Panamá Oeste, Panamá y Colón (Fig.5-6). Los talleres fueron escogidos al azar, representando un 6% de los talleres totales que se encuentran a lo largo de la carretera Panamericana de Panamá. Esta carretera tiene una extensión de 550 kilómetros en un plano longitudinal desde el Oeste (Paso Canoa- Chiriquí) hasta el Este (Yaviza- Darién) del país; incluyendo una extensión de 80 km en un eje transversal desde la carretera Transístmica hasta la provincia de Colón.

La colecta de los mosquitos adultos se realizó con aspiradores de mochila de gran poder de absorción. El aspirador de mochila contaba de un tubo grueso que permitía la colecta de los mosquitos en reposo o durante el vuelo. Fueron utilizados aspiradores manuales con tubos de policarbonato de unas 12 pulgadas de largo y 0.5 pulgadas de diámetro, conectado a un tubo de látex y una boquilla de policarbonato (Figura 7). Las larvas fueron recolectadas mediante búsqueda

activa en neumáticos, además de trampas de oviposición, que consistieron en un recipiente de plástico de 15 cm de alto por 15 cm de diámetro, las cuales fueron llenadas 2/3 de agua y colocadas en los sitios de muestreo. Cada trampa poseía un depresor de lengua de madera (15 cm de largo, 2 cm de ancho y grosor de 2 mm) sustrato como de oviposición (Figura 7).

Se colocaron tres ovitrampas en cada una de las 15 viviendas y 16 talleres en las ocho provincias muestreadas. Estas ovitrampas se dejaron en campo por un periodo de una semana posterior a su colocación. Una vez colectadas las muestras tanto de mosquitos adultos como inmaduros, estas fueron llevadas al laboratorio donde se estableció un protocolo de cría con condiciones óptimas para el desarrollo de todas las etapas del ciclo de vida. Las larvas fueron colocadas en recipientes plásticos (16 oz) con agua que se cambiaba de forma periódica para evitar acumulación de desechos. Como fuente de alimento, se les proporcionó Tretamin®, que es un alimento completo para peces a base de nutrientes de alta calidad, cuya cantidad estaba regulada en base a la cantidad de larvas por envase. Se simulaban las condiciones con la que se desarrollan estos mosquito en la naturaleza, entre ellas, una temperatura de 30°C, humedad relativa de 85 % y ciclos de luz y oscuridad de 12:12 horas en una incubadora. Los envases de las larvas fueron cubiertos con una maya de tul para evitar el

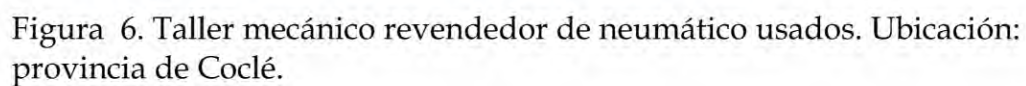
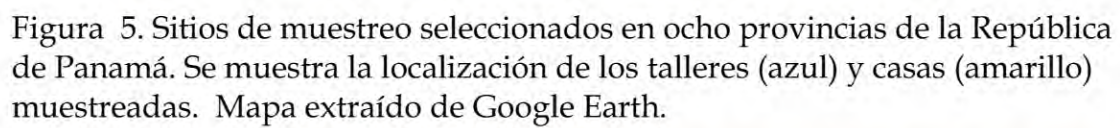




Figura 7. Herramientas utilizadas para colectar los mosquitos en campo. a) Aspirador manual para mosquito adultos. b) Trampas de oviposición u ovitrampa de mosquitos.

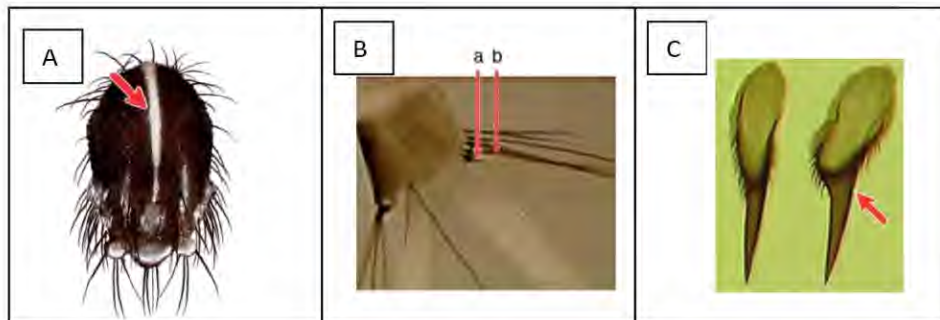


Figura 7. Características morfológicas para la identificación de las larvas y adultos de *Ae. albopictus*. A. Escudo tóraxico mostrando franja de escamas blancas en posición media longitudinal. B. Cepillo ventral con 4 pares de setas simples. C. Escamas del peine sin espinas subapicales.

3.1. Identificación taxonómica y extracción de ADN de las muestras colectadas

Para la identificación taxonómica de los mosquitos colectados utilizamos la clave de Rueda (2004) y la guía para identificar larvas de interés sanitario de Rossi & Almirón (2013) (Figura 8). Los mosquitos identificados fueron colocados de manera individual en tubos Eppendorf con etanol absoluto y almacenados a una temperatura de -20° C para posteriormente extraer el ADN. Para realizar las extracciones de ADN genómico se utilizó el *Kit Blood and Tissue DNA* (Qiagen, Hilden, Alemania). La concentración del ADN extraído fue medido con el espectrofotómetro *nanodrop* 2000 (Thermo Scientific).

3.2. Detección de *Wolbachia* en *Aedes albopictus*

Las detección de infecciones con *Wolbachia* fueron realizadas mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando dos marcadores moleculares *wsp* (*Wolbachia* Surface protein, una proteína de la superficie celular) y el gen ribosomal 16S. Los cebadores utilizados son: *wsp* 81F (5'-TGG TCC AAT AAG TGA TGA AGA AAC-3') y *wsp* 691R (5'-AAA AAT TAA ACG CTA CTC CA-3') para el marcador *wsp* y 16S-Forward (5'-GAA GAT AAT GAC GGT ACT CAC-3') y 16S-Reverse (5'-AGC TTC GAG TGA AAC CAA TTC-3') para el gen 16S (Clarridge, 2004; Simões et al., 2011; Zhou et al., 1998).

Para la amplificación del gen *wsp*, seguimos el protocolo *wsp* estándar utilizamos un volumen de reacción final de 10 µl que consistió de 2 µl de tampón 2x Go Taq Green Master Mix; 0.6 µl de agua libre de nucleasas; 2 µl de cada cebadores; 0.4 µl DMSO al 5 % y 1 µl ADN; los perfiles térmicos del termociclador (Fig. 10) fueron: desnaturalización inicial a 95° durante 2 minutos; 40 ciclos de desnaturalización a 95° por 1 minuto y el recocido a 55° por 1.00 minuto y la extensión a 72° por 1 minuto y finalmente la extensión a 72° por 5 minutos. Para la amplificación del ADNr 16S, utilizamos un protocolo que incluía un volumen de reacción final 10 µl que consiste 2 µl de tampón 2x Go Taq Green Master Mix; 0.6 µl de agua libre de nucleasas; 2 µl de cada cebadores directos e inversos; 0.4 DMSO al 5 % y 1 µl ADN; seguido en el termociclador los perfiles térmicos fueron, la desnaturalización inicial a 95°C durante 2 minutos; 40 ciclos de desnaturalización a 95° por 1 minuto y el recocido a 50° por 1 minuto y la extensión a 72° por 1 minuto y finalmente la extensión a 72° por 7 minutos.

3.3. Clasificación de los supergrupos (A y B) de *Wolbachia* en *Aedes albopictus*

Las muestras donde amplificamos exitosamente el ADN de *Wolbachia* con ambos marcadores (*wsp* / 16 S ARNr) fueron sometidas a una tercera ronda de PCR, con el objetivo de clasificar los supergrupos de *Wolbachia*. Para esto utilizamos cebadores *wsp* específicos, para el supergrupo A (328F y 691R) y para el

supergrupo B (183 F y 691) (Zhou et al., 1998). Para la clasificación de los supergrupos (A y B) mediante el marcador molecular *wsp* se utilizó un volumen de reacción final de 20 µl que consistió en 4 µl de tampón 2x Go Taq Green Master Mix; 1.2 µl de agua libre de nucleasas; 4 µl de cada cebadores directos e inversos; 0,8 DMSO al 5 % y 2 µl ADN. En cuanto a los perfiles térmicos empleados fueron los mismos que se utilizaron para realizar la detección inicial de *Wolbachia* con el marcador molecular *wsp*. Se utilizaron 8 µl del producto de PCR se corrieron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,5 % a 100 V durante 45 minutos en 900 ml de buffer; además se le añadió 5 µl de Ladder 50 pb DNA Step de Promega (Figura 11). Utilizamos como control positivo en cada PCRs una especie dentro del complejo *Culex pipens* (*Culex quinquefasciatus*) que se encuentra naturalmente infectados por *Wolbachia* (Duron et al., 2006), mientras que como control negativo utilizamos agua libre de nucleasas.

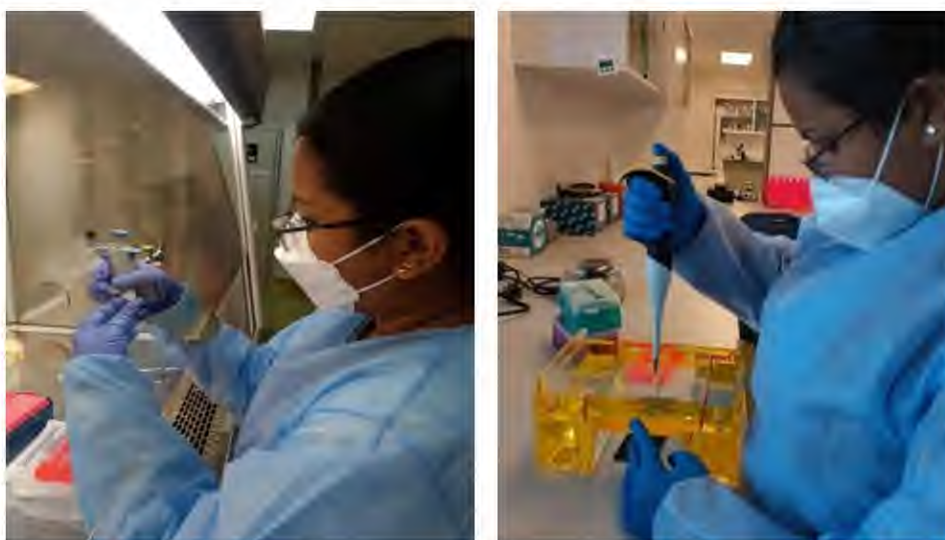


Figura 8. Preparación de las reacciones de PCR y electroforesis en gel

3.4. Técnica de separación de ADN y visualización de bandas de ADN

Todas las amplificaciones de PCR se comprobaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5 % a 103 V durante 40 minutos en geles de agarosa. Los geles se visualizaron en un Chemidoc MP Imaging System-Bio-Rad Laboratory (Figura 10).

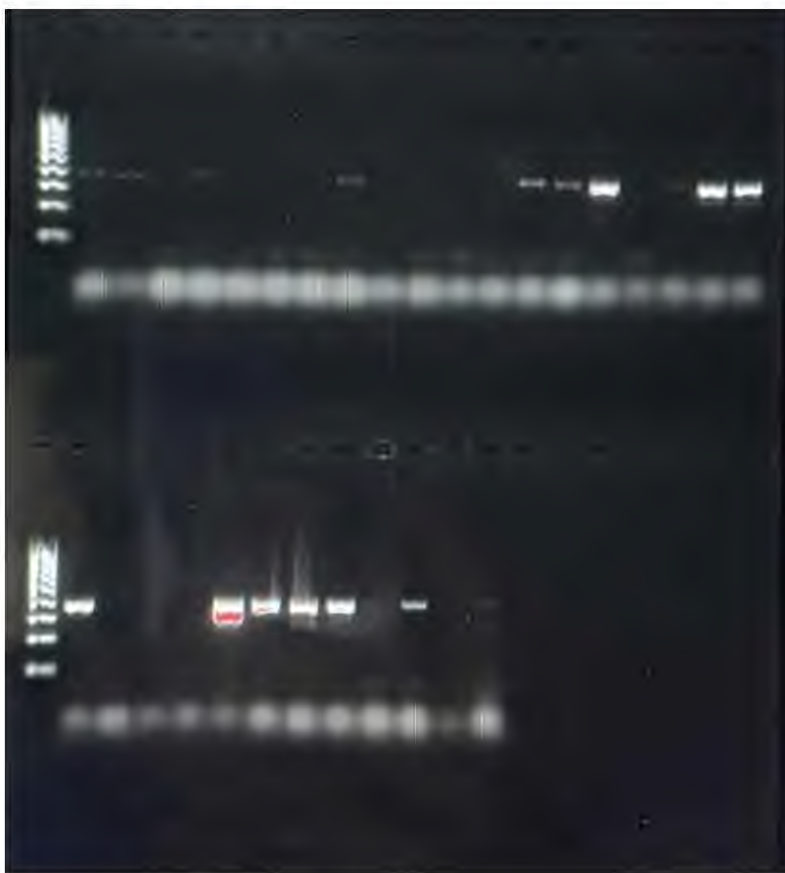


Figura 9. Visualización de fragmentos amplificados mediante PCR en muestras de *Aedes albopictus*.

3.5. Secuenciación *Wolbachia* en *Aedes albopictus*

Para confirmar la presencia de los subgrupos (A / B) de *Wolbachia* en muestras de *Ae. albopictus*, 10 µl del producto de la tercera ronda de PCRs fueron enviados a Macrogen en Corea para realizar la secuenciación de amplicones con la técnica Sanger

(<https://dna.macrogen.com/main.do?dnaSysCdUri=hqo&langCd=DES>). Una vez obtenidas las secuencias de ADN, estas fueron editadas utilizando el Software bioinformático (*Geneious Primer*) para el análisis de datos de secuencias. A su vez el alineamiento múltiple de estas secuencias fue realizado utilizando los algoritmos *Muscle* y *Clustal 7.0*, disponible en el programa *Geneious*. El porcentaje de homología de las secuencias obtenidas fueron evaluadas, a través de la herramienta básica de búsqueda de alineación local de nucleótidos (*BLAST*) (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Finalmente, las secuencias de *Wolbachia* obtenidas de muestras de *Ae. albopictus* de Panamá fueron comparadas con otras disponibles en el banco mundial de genes (*GenBank*) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>)

3.6. Análisis Filogenético de *Wolbachia* en *Aedes albopictus*

Se realizó un primer análisis filogenético con las secuencias obtenidas de las muestras de casa y talleres de Panamá con la finalidad de evaluar la relación

filogenética entre ellas. Construimos un árbol filogenético a través del Análisis genético de evolución molecular en el paquete computacional (MEGA 11) aplicando el método de agrupación de vecino cercano o Neighborjoining (NJ por sus siglas en inglés) (Saitou & Nei, 1987). Se construyó un segundo árbol filogenético utilizando las secuencias de los subgrupos de cepas de *Wolbachia* encontradas en Panamá (WA HWY CH 56, WB1 HWY CH 56, WB2 TWN LS 28), con la finalidad de establecer las distancias evolutivas con otras secuencias de diferentes cepas de *Wolbachia* tomadas del banco mundial de genes (GenBank) (wAlb-AF020058, wAlb-AF020059, Wpip-AF020060 y wMelB_AF020064). En estos árboles utilizamos como grupo externo a *Brugia pahangi*-AJ252175 (Bazzocchi et al., 2000)

3.7. Análisis estadístico para investigar la asociación entre la presencia de infecciones de *Wolbachia* en *Aedes albopictus* y las distancias desde las carreteras en Panamá.

Para estimar la asociación entre las distancias de las carreteras sobre la presencia o no de infecciones de *Wolbachia* en *Ae. albopictus* de los 31 sitio de muestreos (15 casas y 16 talleres), se aplicó un análisis de modelo lineal generalizado (GLM) con una distribución de binomial; consideramos las estimaciones de coeficiente y los Odds Ratios (OR) de las variables predictoras (altitud, distancia en línea

recta y la distancia por la carretera a la autopista). Para este análisis se ejecutaron dos modelos independientes; el primero considerando la distancia a la autopista en línea recta y en el segundo modelo a la distancia por la carretera a la autopista. Para las estimaciones de distancias en línea recta a la autopista utilizamos la herramienta *Google Earth*, utilizando la regla de este sistema de información geográfica cruzamos una línea desde cada uno de los 31 sitios de muestreo a la autopista, para esto se realizaron tres mediciones en 300 m 600 m y 1000 m, una vez obtenidos estos datos se calculó el error de la medición, el valor promedio estimando el valor de distancia máxima menos el valor de distancia mínima.

Para realizar las estimaciones de distancias a la carretera a la calle principal o autopista más cercana utilizamos *Google Map*, una herramienta completa que nos permitió obtener las distancias más cortas cada uno de los 31 sitios de muestreo por la carretera hasta la carretera principal o autopista más cercana. De igual manera utilizando esta *Google Map* se tomaron los valores de elevación para el análisis de ambos modelos.

4. RESULTADOS

A través de la identificación morfológica determinamos que un total de 661 mosquitos pertenecían a la especie *Ae. albopictus*, de los cuales 125 (18.91%) eran larvas y 536 (81.09%) adultos (Tabla Suplementaria 1). De estos 661 mosquitos, 317 (47.9%) fueron capturados en casas y 290 (43.9%) en talleres para la compra y venta de llantas usadas.

4.1. Tasa global de infección por *Wolbachia* en *Aedes albopictus*

Se examinaron todas las muestras colectadas de *Ae. albopictus* (es decir, 661 mosquitos) para determinar la presencia de infecciones por *Wolbachia*, a través de tres pruebas de PCRs independientes utilizando los marcadores moleculares (*wsp* y 16S). La primera ronda de PCR con el gen 16S arrojó que 30.5% (202 de un total de 661 mosquitos) resultaron positivos para la infección con *Wolbachia*, mientras que 60.4% mosquitos (399/661) resultaron positivos por PCR con el gen *wsp* (Tabla 3). Finalmente, 28.44% (188/661) individuos de *Ae. albopictus* dieron positivo para ambos marcadores (*wsp* y 16S) como se muestra en la Tabla 3.

Tabla 3. Detección de *Wolbachia* en *Ae. albopictus* de Panamá por tipo de local y ubicación geográfica, mediante amplificación por PCR de los genes wsp (PCR-1) y 16S (PCR-2) y tipificación de genotipos de *Wolbachia* utilizando marcadores específicos del gen wsp (PCR-3).

Provincia	Localidad	Tipo de Local	Año	N	PCR-1 PCR-2	PCR 3
Colón	Sabanitas	Casa	2016	11	0	0
Panamá	Caminos de Omar	Casa	2015	18	3	3
Panamá	Monterico	Taller	2015	18	1	1
Panamá	Chilibre	Casa	2016	12	0	0
Panamá Oeste	Princesa Mia	Casa	2015	12	0	0
Panamá Oeste	Arraiján	Taller	2015	24	6	6
Coclé	El Cope	Casa	2016	6	0	0
Coclé	Santa Rita	Taller	2016	5	4	4
Herrera	Santa María	Casa	2016	12	0	0
Herrera	Divisa	Taller	2016	9	3	3
Herrera	Chupampa	Taller	2015	12	4	4
Los Santos	La Villa	Casa	2016	22	2	2
Los Santos	Macaracas	Casa	2016	13	0	0
Los Santos	Paritilla	Casa	2016	18	4	3
Los Santos	Tonosí	Casa	2016	91	11	7
Los Santos	El Cacao	Casa	2016	102	3	3
Veraguas	Santa Fe	Casa	2016	6	5	3
Veraguas	Cerro Redondo La Mesa	Taller	2016	44	33	33
Chiriquí	Pueblito	Taller	2016	10	2	2

Chiriquí	Horconcito	Taller	2016	18	18	18
Chiriquí	Gualaca	Casa	2016	24	3	3
Chiriquí	El Jazmin	Taller	2016	15	9	9
Chiriquí	David	Tall	2016	16	4	4
Chiriquí	Boquete	Taller	2016	4	1	1
Chiriquí	San Pablo Viejo Abajo	Taller	2016	59	48	47
Chiriquí	Bagala	Taller	2016	11	9	9
Chiriquí	Concepción	Taller	2016	15	6	6
Chiriquí	Varital	Taller	2016	9	1	1
Chiriquí	San Vicente	Casa	2015	18	2	2
Chiriquí	Bongo abajo	Casa	2015	6	2	2
Chiriquí	Paso Canoa	Taller	2016	21	4	4

4.2. Distribución de *Aedes albopictus* infectados con *Wolbachia* en Panamá

De acuerdo a los resultados de las dos primeras pruebas de PCR utilizando los genes *wsp* y 16S, tenemos que todas las provincias muestreadas, a excepción de Colón presentaron individuos de *Ae. albopictus* positivos para *Wolbachia*. En cuanto a las localidades muestreadas podemos mencionar que 15 correspondían a viviendas mientras que 16 eran talleres independientes para la compra y venta de llantas usadas, arrojando un total de 31 localidades de las cuales 25 tenían mosquitos *Ae. albopictus* positivos para la infección con la bacteria *Wolbachia*; de estas localidades 16 correspondían a talleres y 9 a viviendas (Tabla 3).

Tabla 6. Tasa de infección de *Wolbachia*, en recorrido lineal por la autopista y la distancia por carretera a la autopista.

Localidades	Tasa de infección	Distancia en línea recta a la carretera (m)	Max. mínimo	Distancia por carretera a la autopista (m)	Altitud (m)
Sabanitas	0.00 %	1023.59	60.62	1525.00	18.48
Camino de Omar	17.00 %	482.84	27.34	751.00	23.27
Monterico	6.00 %	504.69	11.83	850.00	33.78
Chilibre	0.00 %	826.55	14.03	1250.00	10.21
Princesa Mia	0.00 %	3351.42	69.06	4200.00	76.20
Arraiján	25.00 %	29.14	13.62	29.14	20.12
El Cope	0.00 %	2257.51	100.71	4300.00	172.07
Santa Rita	80.00 %	22.61	1.60	22.61	29.35
Santa María	0.00 %	775.79	23.04	1200.00	18.82
Divisa	33.30 %	22.12	2.37	22.12	29.50
Chupampa	33.30 %	103.94	13.97	120.00	30.90
La Villa	9.10 %	333.94	26.53	810.00	46.17
Macaracas	0.00 %	956.10	130.00	1100.00	112.86
Paritilla	17.00%	478.78	20.40	510.00	28.12
Tonosí	6.70 %	252.67	16.20	303.00	10.14
El Cacao	2.90 %	29.40	6.75	29.40	15.64
Santa Fe	50.00 %	316.52	10.10	414.00	428.87
Cerro Redondo La Mesa	75.00 %	15.87	3.77	15.87	157.97
Pueblito	20.00 %	12.48	1.44	12.48	26.44
Horconcito	100.00 %	26.75	2.31	26.75	44.36
Gualaca	12.50 %	452.15	18.30	621.00	127.16
El Jazmín	60.00 %	44.31	4.97	44.31	45.02
David	25.00 %	41.55	21.08	41.55	40.87
Boquete	25.00 %	174.04	30.00	195	1088.00

San Pablo Viejo Abajo	79.60 %	58.13	10.47	58.13	75.52
Bagala	81.80 %	46.03	19.08	46.03	60.23
Concepción	40.00 %	49.84	19.44	49.84	44.89
Varital	11.10 %	41.40	14.37	41.40	58.13
San Vicente	11.10%	97.73	3.42	110.00	448.03
Bongo abajo	30.00 % *	1619.44	30.87	7400.00	402.06
Paso Canoa	19.00 %	29.03	2.03	29.03	114.91

4.3. Clasificación de los supergrupos A y B de *Wolbachia* en *Aedes albopictus*

Los 188 individuos de *Ae. albopictus* que resultaron positivos para *Wolbachia* en las dos pruebas de PCR iniciales (con los genes *wsp* y *16S*) fueron sometidos a una tercera ronda de PCR para tipificar los supergrupos A y B de *Wolbachia* utilizando como marcador otro set de cebadores específicos para el gen *wsp*, dada su especificidad para separar los Supergrupos A y B de *Wolbachia*. Los resultados indican que 180/188 mosquitos amplificaron para los Supergrupos A o B de *Wolbachia*, es decir 14 *Ae. albopictus* amplificaron individualmente para el Supergrupo A, 76 únicamente para el Supergrupo B y otros 90 mosquitos resultaron positivos para ambos Supergrupos (es decir A y B).

4.4. Secuenciación y análisis filogenético de las cepas de *Wolbachia* en *Aedes albopictus*.

De los 180 *Ae. albopictus* que amplificaron únicamente para A y/o B, se escogieron 103 individuos para ser secuenciados a través del método Sanger, dichos mosquitos fueron escogidos tomando en cuenta a todas las 25 localidades que contenían muestras positivas para la presencia de *Wolbachia* (Mayor representatividad en el espacio) e incluyendo un número similar de muestras por

cada una de estas localidades (Igual probabilidad de ocurrencia). De estos 103 individuos, 70 (68.0%) fueron secuenciados exitosamente para *Wolbachia*. En total obtuvimos 95 secuencias parciales del gen *wsp* de la bacteria *Wolbachia*, las cuales 30 (31.57%) corresponden a la cepa *wAlbA* del Supergrupo A y 61 (64.21%) secuencias pertenecían a la variante *wAlbB* y únicamente cuatro (4.2%) a la variante *wPip* del Supergrupo B (Figura 13)

El porcentaje de homología de cada una de las secuencias se evaluó utilizando el algoritmo básico de búsqueda de alineación local (BLAST, por sus siglas) de la página web del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI, por sus siglas en inglés). Las secuencias agrupadas en el subclado de mayor tamaño (Figura 13) corresponden al supergrupo B las mismas comparten un porcentaje de homología de 100% con la cepa *wAlbB* (AF020059) de *Ae. albopictus*, igualmente el subclado de menor tamaño compartió un porcentaje de homología de 100% pero con la cepa *wPip* (AF020064) de *Culex pipiens*. Finalmente, el clado del supergrupo A mostró un porcentaje de homología de 100% con la cepa *wAlbA* (AF020058) de *Ae. albopictus* (Figura 13).

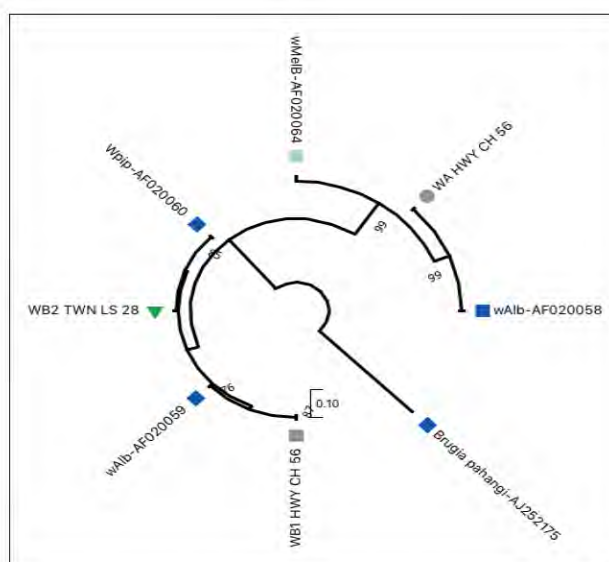


Figura 10. Secuencias del gen *wsp* de *Wolbachia* para Panamá (WA HWY CH 56, WB1 HWY CH 56, WB1 HWY CH 56) y otras regiones del mundo (wAlb-AF020058, wAlb-AF020059 y Wpip-AF020060).

El árbol filogenético NJ demuestra que las secuencias se agruparon en dos clúster o linajes principales. El clúster de mayor tamaño agrupó 65 secuencias pertenecientes al Supergrupo B y presentó un valor de soporte estadístico (Bootstrap) de 61% (Figura 13). Este clúster o linaje se subdividió en dos subclados internos, uno de mayor tamaño con 61 secuencias que pertenecen a la cepa wAlbB y el otro de menor tamaño 4 secuencias las cuales corresponden a wPip. Por otro lado, el clúster del Supergrupo A esta conformado por 30 secuencias pertenecientes a la variante wAlbA, cuyo valor de soporte estadístico (Bootstrap) fue 75% (Figura 13).

La cepa wAlbB aislada de *Ae. albopictus* fue encontrada sola en 22 localidades y 7 provincias (Chiriquí, Veraguas, Los Santos, Herrera, Coclé, Panamá y Panamá Oeste), mientras que la cepa wAlbA se encontró en 17 localidades y 7 provincias (Chiriquí, Veraguas, Los Santos, Herrera, Coclé, Panamá y Panamá Oeste) y finalmente la infección de wPip se registró en 4 localidades de cuatro provincias (Panamá Oeste, Chiriquí, Veraguas y Los Santos) la misma no presentó co-infección, lo contrario sucedió con las cepas wAlbA y wAlbB las cuales se encontraron en co-infección en 15 localidades y provincias (Chiriquí, Veraguas, Los Santos, Herrera, Coclé y Panamá Oeste) (Tabla Suplementaria 1).

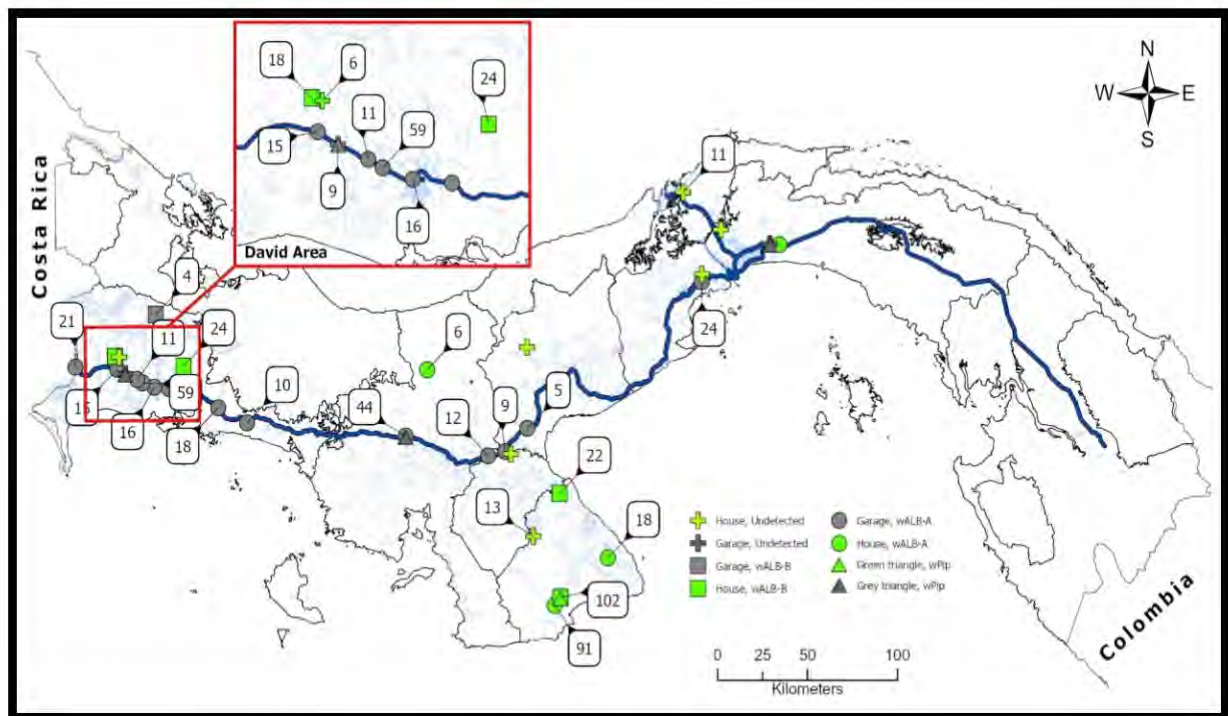


Figura 12. Distribución de cepas de *Wolbachia* (wAlbA, wAlbB y wPip) en mosquitos *Ae. albopictus* a lo largo de la carretera Panamericana en Panamá.

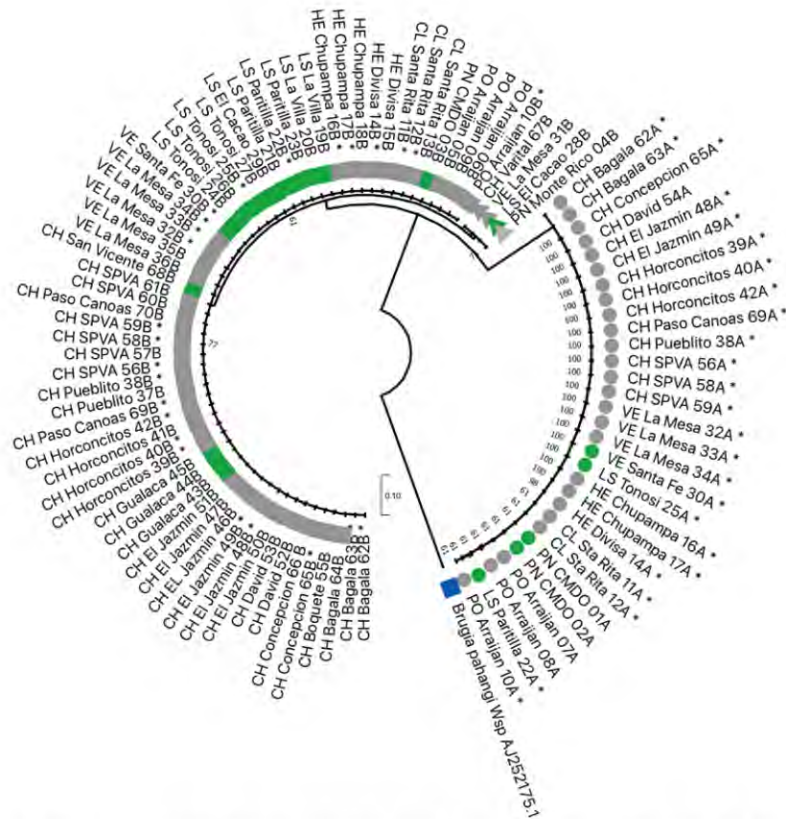


Figura 11. Árbol filogenético reconstruido mediante el método de neighbor-joining (NJ) o vecino cercano basado en las secuencias del gen wsp de *Wolbachia* de *Ae. albopictus* colectados a lo largo de la República de Panamá. La cepa wAlbaA se distingue con un círculo; con un cuadrado la cepa wAlbB y con un triángulo la cepa wPip. Las muestras colectadas se marcan en casa y aquellas colectadas en talleres en gris. El grupo externo corresponde a la secuencia de wsp de la cepa de *Wolbachia* de la filaria *Brugia palanghi*, obtenida de GenBank. El nombre de cada muestra consiste de las iniciales de la provincia, localidad y número de secuencia; el asterisco representa doble infección para esa muestra. Los valores en cada nodo corresponden al valor de arranque (Bootstrap de 1000 repeticiones). La barra representa la distancia genética.

4.5. Asociación entre la presencia o ausencia de *Aedes albopictus* infectados con *Wolbachia* y las características topográficas de Panamá.

Los resultados del modelo de regresión logística utilizando la altura y la distancia en línea recta desde el sitio de colecta del mosquito hasta la carretera Panamericana como predictores de la presencia de *Ae. albopictus* infectado con *Wolbachia* se muestran en el (Tabla 4). Los resultados de este análisis indican que existe una asociación positiva entre la presencia de mosquitos infectados con *Wolbachia* y la altura en metros (m) sobre el nivel del mar, siendo esta asociación ligeramente estadísticamente significativa (Cuadro 4). Por otro lado, la presencia de mosquitos infectados con *Wolbachia* se asocia negativamente con la distancia en línea recta desde el punto de colecta y la carretera Panamericana, siendo esta asociación estadísticamente significativa. En este primer modelo, el coeficiente de asociación $b1$ es negativo y sugiere que, por cada aumento de 1 kilómetro en la distancia desde la carretera principal hasta el punto de colecta del mosquito, la probabilidad de encontrar mosquitos infectados con *Wolbachia* disminuye en 2.6% (Tabla 4).

Los resultados del segundo modelo de regresión logística utilizando la altura y la distancia a la carretera; es decir, controlando por la posible ruta de dispersión del mosquito, muestran resultados muy similares al primer modelo de regresión logística (Tablas 4 y 5). Sin embargo, el valor del coeficiente AIC es más elevado

en el segundo modelo, y por lo tanto, el mismo posee menor poder predictivo y robustez estadística.

Tabla 4. Resultados del modelo de Regresión Logística utilizando la altura y la distancia en línea recta desde el sitio de colecta del mosquito hasta la carretera Panamericana como predictores de la presencia o ausencia de *Ae. albopictus* infectado con *Wolbachia*.

	Estimación	Error estándar	P
Intercepto	-0.93	0.132	0.001
Altitud	0.002	0.001	0.014
Distancia directa a la autopista	-0.026	0.001	0.001
	OR	Error estándar	P
Intercepto	0.394	1.141	0.001
Altitud	1.002	1.001	0.012
Distancia directa a la autopista	0.974	1.001	0.002

Tabla 5. Resultados del modelo de Regresión Logística utilizando la altura y la distancia sobre la carretera desde el sitio de colecta del mosquito hasta la carretera Panamericana como predictores de la presencia o ausencia de *Ae. albopictus* infectado con *Wolbachia*.

	Estimación	Error estándar	P
Intercepto	-1.168	0.126	0.001
Altitud	0.002	0.001	0.012
Distancia por la carretera a la autopista	-0.001	0	0.002
	OR	Error estándar	P
Intercepto	0.311	1.134	0.001
Altitud	1.002	1.001	0.012
Distancia por la carretera a la autopista	0.999	1	0.002

4.6. Predicción de la probabilidad de infección con *Wolbachia* en *Ae. albopictus* asociado a las características topográficas de Panamá y la densidad de carretera.

Los resultados del Modelo Lineal Generalizado (GLM) (Cuadro 6), donde se analizan los factores que influyen en la probabilidad de un evento ocurra, en nuestro caso probabilidad de que *Ae. albopictus* infectado con *Wolbachia* esté presente o no; utilizando las siguientes variables: distancia en línea recta desde el sitio de colecta de mosquito hasta la carretera Panamericana, la altitud y la

densidad de carreteras de cada sitio de muestreo. Se obtuvieron los siguientes resultados: A mayor distancia a la carretera Panamericana (OR: 0.997), menor es la probabilidad de presencia de *Ae. albopictus* infectados con *Wolbachia*. Una mayor altitud (OR:1.002), aumenta ligeramente la probabilidad de encontrar *Ae. albopictus* infectados, mientras que a mayor densidad de carreteras (OR:1.185), favorece significativamente la probabilidad de encontrar *Ae. albopictus* infectados con *Wolbachia*. Todos estos resultados son estadísticamente significativos (<0.01) y apuntan a que la densidad de carreteras de un área geográfica determinada favorece la dispersión de *Ae. albopictus* con *Wolbachia*.

Cuadro 6. Resultados del Modelo lineal Generalizado (GLM) utilizando la densidad de carreteras, altura y la distancia sobre la carretera desde el sitio de colecta del mosquito hasta la carretera Panamericana como predictores de la presencia o ausencia de *Ae. albopictus* infectado con *Wolbachia*.

	Odds Ratios	Standard Error	P
Intercepto	0.282	0.179	<0.01
Distancia en línea recta a la carretera Panamericana (km)	0.997	0.001	<0.01
Altitud (m)	1.002	0.001	<0.01
Densidad de carretera (carreteras/km)	1.185	0.057	<0.01

5. DISCUSIÓN

En este estudio encontramos una baja tasa de infección de *Wolbachia* (28.44%) en los 661 *Ae. albopictus* estudiados. Este hallazgo coincide con algunos estudios realizados anteriormente, pero también contrasta con muchos otros (Tabla 1). Por ejemplo, tasas de detección de *Wolbachia* en *Ae. albopictus* por debajo del 50% fueron obtenidas de estudios realizados en Panamá (15%) (Bennett et al., 2019), México (40%) (Puerta-Guardo et al., 2020), Colombia (38.95 %) (Duque-Granda et al., 2022); y Malasia (25%), donde en el caso de este último estudio solo estudiaron larvas (Kim et al., 2017). Por otro lado, nuestros resultados contrastan con aquellos de otros trabajos realizados en países dentro del rango de origen de *Ae. albopictus*, entre ellos, Malasia (100%) (Joanne et al., 2015), China (93.4%) (Hu et al., 2020), Corea del Sur (97.1%) (Parks et al., 2017), India (87.3%) (Mohanty et al., 2021). Adicionalmente, países americanos fuera del rango originario de *Ae. albopictus* como Brasil (95%) (Albuquerque et al., 2011), Argentina (80.8%) (Chuchuy et al., 2018) y Cuba (91%) (Ruiza et al., 2022), también mostraron altas tasas de infección por *Wolbachia*.

Para determinar la tasa de infección por *Wolbachia* en *Ae. albopictus* utilizamos el gen ribosomal 16S debido a que es altamente conservado y sirve como marcador universal para detectar la presencia de bacterias en el orden rickettsiales.

Además, utilizamos también el gen de la proteína de la superficie (*wsp*) que tiene más regiones variables y mayor especificidad en las detecciones de *Wolbachia*. Obtuvimos una tasa de infección de *Wolbachia* del 60% con el marcador 16S y de 30% usando el marcador *wsp*. Esta diferencia debida probablemente a una mayor sensibilidad del segundo marcador lo cual puede reducir el riesgo de falsos positivos y confusión en la identificación de bacterias similares a *Wolbachia*. En la mayoría de los estudios de detección de infecciones por *Wolbachia* en *Ae. albopictus* (Tabla 1) se ha utilizado el gen *wsp*, seguido de otros pocos estudios donde se utilizó la combinación de ambos de los genes *wsp* y 16S, como es el caso de nuestro trabajo. Es importante recalcar entonces que nuestros resultados no son directamente comparables con aquellos de la Tabla 1.

Pocos son los estudios que han utilizado otro marcador molecular como el de Tipificación de Secuencias Multilocus (MLST), que es un método de análisis molecular que se basa en secuenciar fragmentos de genes (*gatB*, *coxA*, *hcpA* o *ftsZ*) estables en bacterias como *Wolbachia* para reconocer y tipificar cepas bacterianas. Baldo & Werren no recomiendan usar *wsp* para clasificar las cepas. En su lugar, estos autores recomiendan el uso del sistema MLST, preferiblemente con todos sus genes, aunque secuenciar algunos genes individuales podría servir como una identificación provisional. Además, reconocen que los supergrupos de

Wolbachia están genéticamente muy relacionados, lo que respalda la propuesta de que todos forman parte de una única especie (Baldo & Werren, 2007).

La baja tasa de infección obtenida en este trabajo podría reflejar que las infecciones por *Wolbachia* en *Ae. albopictus* no han alcanzado el establecimiento en las poblaciones locales, probablemente por su reciente introducción en Panamá en el año 2002 (Miller & Loaiza, 2015). Para que *Wolbachia* alcance una elevada tasa de infección en su hospedero se requieren ciertas condiciones como, por ejemplo, a mayor número de introducciones de *Ae. albopictus* en Panamá mayor es la probabilidad de introducir mosquitos infectados con distintas cepas de *Wolbachia* a un área geográfica determinada. Es posible que la tasa de infección pueda estar determinada por la proporción de los mosquitos infectados que invadieron el país inicialmente. Además, su propagación efectiva en poblaciones locales depende de la capacidad de dispersión activa y pasiva del hospedero.

De acuerdo con el análisis de árbol filogenético de vecinos cercanos (NJ), en Panamá se determinaron tres cepas de *Wolbachia* [*wAlbaA* (supergrupo A) y *wAlbB*, *wPip* (subgrupo B)] para los mosquitos estudiados. Las cepas *wAlbaA* y *wAlbB* se encuentran distribuidas ampliamente en todo el país con excepción de la provincia de Colón, muy probablemente debido a las pocas muestras que se obtuvieron de esta región del país. En su mayoría, las secuencias de *Wolbachia*

obtenidas pertenecen a las cepas wAlbB, seguido de la cepa wAlbA. Además, la cepa *Wpip* en cuatro muestras de *Ae. albopictus* provenientes de Varital, La Mesa, El Cacao y Monterico, respectivamente. Esta cepa *Wpip* no es una cepa natural de *Ae. albopictus*, pero un estudio de Nulur y colaboradores, detectó esta misma cepa en *Ae. albopictus* anteriormente, describiendo que *Wpip* pertenece al Supergrupo B con números de acceso JX129186 (Kuala Lumpur-Malasia) y AY462863 (Taiwán) en el GenBank; las secuencias wAlbB y wPip se agruparon dentro de la cepa Pip de *Wolbachia*.

Nuestros resultados no difieren sustancialmente de la mayoría de los estudios de identificación de cepas de *Wolbachia* en *Ae. albopictus*, en los cuales se han detectado infecciones dobles con wAlbA y wAlbB (Joanne et al., 2015; Noor Afizah et al., 2015; Hu et al., 2020). Las co-infecciones del supergrupo (A y B) de *Wolbachia* son comunes; sin embargo, las infecciones simples del Supergrupo B raras veces superan el 30% de las infecciones (Cuadro 1) (Wiwatanaratnabutr & Kittayapong, 2009). Las secuencias wAlbB analizadas mostraron similitud con las de Kuala Lumpur y Taiwán (Ismail et al., 2021). El estudio realizado en Taiwán describe a *Ae. albopictus* con una doble infección wAlbA y un Subgrupo denominado Pip, basado en el gen *wsp*. Por otro lado, una investigación de Tsai y colaboradores, apoyados por un Árbol filogenético de *Wolbachia* basado en las secuencias *wsp*, describen una relación filogenética de *Culex pipientis* (especie

donde si se encuentra wPip de manera natural) y *Ae. albopictus* para subgrupo Pip con un *bootstrap* de 100% (Tsai et al., 2004). Un último estudio, detalla que *Ae. albopictus* se encuentra dentro de un grupo Pip de la cepa wAlbB (AF020059) de GenBank, también basados en gen *wsp* para la tipificación de *Wolbachia* (Zhou et al., 1998). Existe una discrepancia con la clasificación de wPip ya que es denominada: cepa, subgrupo y grupo, respectivamente, lo que podría causar confusión al momento de describirla o tipificarla.

En el presente estudio la tasa de infección por *Wolbachia* en *Ae. albopictus* fue mayor en talleres (52.76%) que en casas (11.04%). En 2019, un estudio realizado por Bennett y colaboradores reportó una elevada tasa de ocurrencia de *Ae. albopictus* en talleres para la compra y venta de llantas usadas en interior del país. Es decir, a 17 años desde su primer reporte en Panamá, el mosquito ya había colonizado gran parte del territorio nacional, muy probablemente por medio del uso de las carreteras como método principal de dispersión. Este agresivo mecanismo de colonización espacial por las carreteras a través del transporte de neumáticos usados podría explicar en parte estas diferencias. La eficiente dispersión del *Ae. albopictus* en Panamá y elevadas tasas de transmisión vertical de *Wolbachia* pudieran explicar la rápida y agresiva expansión de esta especie junto con sus bacterias simbiotes a lo largo de la carretera Panamericana. De ser cierto esto, a mayor capacidad de expansión pasiva de *Ae. albopictus*, mayor

es la probabilidad de que las *Wolbachia* se propaguen y establezcan tasas de infección mayores en las poblaciones locales de este hospedero (Hancock & Godfray, 2012). No obstante, es necesario investigar más a fondo como se distribuyen los neumáticos usados en el país, en términos de la dirección, volumen y frecuencia de transporte para predecir los cambios potenciales en el establecimiento de *Wolbachia* en las poblaciones de *Ae. albopictus* (Hancock et al., 2012). Por otro lado, la amplia distribución de las cepas wAlbA y wAlbB a nivel nacional también aporta evidencia indirecta sobre el papel que potencialmente juegan las carreteras principales como corredores claves para el transporte pasivo de *Ae. albopictus*, mediado por el hombre, contribuyendo así con flujo genético entre poblaciones y a la dispersión efectiva de *Wolbachia*.

En contraste, las infecciones por *Wolbachia* en *Ae. albopictus* colectado en viviendas es notablemente menor. Es posible que el menor flujo y volumen de introducciones del mosquito en áreas remotas y alejadas del sistema primario de trasiego de llantas usadas disminuya la probabilidad de encontrar mosquitos infectados con *Wolbachia* debido a: (1) poblaciones aisladas y vulnerables a mayores tasas de mortalidad, (2) Poblaciones pequeñas con menores probabilidades de apareamiento, y (3) poblaciones que se dispersan activamente mediante el vuelo de sus adultos pero que no son beneficiadas por el transporte pasivo de neumáticos usados. Nuestros resultados apoyan esta noción

parcialmente, por ejemplo, en nuestro trabajo se demostró, que existe una relación entre las tasas de infección de *Wolbachia* en *Ae. albopictus* y las distancias que se pueden desplazar los mosquitos pasivamente por medios terrestres. Los resultados de los modelos utilizados indican que las infecciones de *Wolbachia* tienden disminuir por cada kilómetro de distancia en línea recta desde una carretera primaria al sitio de colecta del mosquito.

En Panamá, las redes de carreteras como vías de dispersión y del transporte de neumáticos usados son las que mejor explican la expansión de *Ae. albopictus* (Bennett, Gómez Martínez, et al., 2019; Miller & Loaiza, 2015). Estudios previos han reportado evidencias similares en varios países, incluyendo a los Estados Unidos de América (Moore, 1999), Argentina (Díaz et al., 2019), Perú (Guagliardo et al., 2019), Colombia (Echeverry-ca et al., 2021), Suiza (Müller et al., 2020) y Francia (Schaffner & Karch, 2000). La distribución de los hábitats adecuados para el huésped y cómo se mueven estos huéspedes en su entorno son factores clave para entender qué tan rápido se propaga una infección por *Wolbachia*. Si los lugares donde el huésped puede vivir o reproducirse están cerca unos de otros y dentro del alcance de movimiento del huésped, la infección se propagará más rápidamente (Hancock & Godfray, 2012). Esto coincide parcialmente con los resultados de nuestro trabajo donde una mayor densidad de carreteras correlaciona positivamente con una mayor probabilidad de encontrar mosquitos

infectados con *Wolbachia*. En conjunto nuestros resultados apuntan hacia la existencia de una mayor conectividad poblacional del mosquito *Ae. albopictus* a lo largo de las principales carreteras del país, donde las bacterias del género *Wolbachia* se propagan junto con su principal huésped. Por ejemplo, en España del 2004 hasta el 2014 se documentó una expansión continua de *Ae. albopictus* a lo largo de la costa mediterránea y en la actualidad está presente en todas las provincias mediterráneas y donde la especie continúa expandiéndose pasivamente por la carretera y potencialmente su bacteria endosimbionte también lo está haciendo (Collantes et al., 2015). Sin embargo, futuros estudios tendrán que verificar esta hipótesis.

Los resultados de nuestro trabajo plantean una línea base de conocimiento ecológico que nos permite mejorar las estrategias de dispersión de *Ae. aegypti* transinfectado con *Wolbachia*, utilizando el conocimiento que tenemos sobre la dispersión de *Ae. albopictus* y sus bacterias asociadas en Panamá. Por ejemplo, las estrategias de control basadas en la bacteria *Wolbachia* tendrán que tomar en cuenta la mayor probabilidad de propagación de la bacteria por las áreas urbanas donde el mosquito se transporta pasivamente, y la necesidad de liberar más mosquitos transinfectados en lugares alejados de los centros urbanos para lograr un control óptimo.

6. CONCLUSIONES

- Durante el presente estudio obtuvimos una tasa global de infección con *Wolbachia* en *Ae. albopictus* de 28.4%.
- Todos los 16 talleres donde se colectaron muestras para el estudio tenían mosquitos infectados con *Wolbachia* (100%), mientras que solo nueve de quince casas (60%) tenían mosquitos infectados con *Wolbachia*. De igual manera, la tasa de infección en *Ae. albopictus* colectados en talleres fue mayor (52,76%) que la de mosquitos colectados en casas (11,04%).
- En nuestro estudio se detectaron tres cepas de *Wolbachia* en *Ae. albopictus* de los supergrupos A (wAlbA) y B (wAlbB y wPip), de las cuales dos son habituales comensales en este mosquito (wAlbA, wAlbB), y una ha sido utilizada en liberaciones para control vectorial (wPip).
- Las cepas wAlbA y wAlbB se encuentran ampliamente distribuidas en ocho provincias de Panamá, mientras que wPip posee una distribución más restringida.
- Las características geográficas del punto de colecta de los mosquitos tienen relación con la probabilidad de infección por *Wolbachia*. A mayor distancia entre el lugar de colecta y las carreteras menor es la probabilidad de infección, mientras a mayor densidad de carreteras mayor es esta probabilidad.

7. RECOMENDACIONES

Nuestros resultados de detección e identificación de cepas de *Wolbachia* en *Ae. albopictus* de Panamá fueron obtenidos mediante la técnica de PCR convencional. Recomendamos a futuro el uso de técnicas complementarias como PCR en tiempo real para evaluar las densidades de *Wolbachia* en *Ae. albopictus*.

Futuros estudios sobre la presencia de *Wolbachia* en *Ae. albopictus* deberán tomar en cuenta más sitios de muestreo a nivel nacional y los parámetros ambientales (Temperatura, precipitación y humedad relativa) de estos sitios para evaluar su influencia en la tasa de infección.

Los resultados de este trabajo deben ser tomados en cuenta por departamento de control de vectores del Ministerio de Salud para ajustar los esfuerzos de mitigación de enfermedades arbovirales a través del uso de la bacteria *Wolbachia*.

8. REFERENCIA BIBLIOGRAFICA

- Ahmad, N. A., Vythilingam, I., Lim, Y. A. L., Zabari, N. Z. A. M., & Lee, H. L. (2017). Detection of Wolbachia in aedes albopictus and their effects on chikungunya virus. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 96(1), 148–156. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.16-0516>
- Albuquerque, A. L., Magalhães, Albuquerque, A. L., Magalhães, T., & Ayres, C. F. J. (2011). High prevalence and lack of diversity of Wolbachia pipientis in Aedes albopictus populations from Northeast Brazil. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 106(6), 773–776. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762011000600021>
- Baldo, L., & Werren, J. H. (2007). *Revisiting Wolbachia Supergroup Typing Based on WSP : Spurious Lineages and Discordance with MLST*. 55, 81–87. <https://doi.org/10.1007/s00284-007-0055-8>
- Bennett, K. L., Gómez-Martínez, C., Chin, Y., Saltonstall, K., McMillan, W. O., Rovira, J. R., & Loaiza, J. R. (2019). Dynamics and diversity of bacteria associated with the disease vectors Aedes aegypti and Aedes albopictus. *Scientific Reports*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-48414-8>
- Chuchuy, A., Rodriguero, M. S., Ferrari, W., Ciota, A. T., Kramer, L. D., & Micieli, M. V. (2018). Biological characterization of Aedes albopictus (

- Diptera : Culicidae) in Argentina : implications for arbovirus transmission. *Scientific Report*, March, 1–8. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-23401-7>
- Collantes, F., Delacour, S., Alarcón-Elbal, P. M., Ruiz-Arrondo, I., Delgado, J. A., Torrell-Sorio, A., Bengoa, M., Eritja, R., Miranda, M. Á., Molina, R., & Lucientes, J. (2015). Review of ten-years presence of *Aedes albopictus* in Spain 2004-2014: known distribution and public health concerns. *Parasites and Vectors*, 8(1). <https://doi.org/10.1186/s13071-015-1262-y>
- Díaz, Y., Quiroz, E., Carrera, J., Cisneros, J., Mosca, I. B. De, Armi, B., Chen, R., & Vasilakis, N. (2019). *Molecular Epidemiology of Dengue in Panama* : 1–21.
- Duque-Granda, D., Posada-Mejía, J. A., Velez-Quiroz, M. A., Cadavid-Restrepo, G., Moreno-Herrera, C. X., & Gómez, R. J. V. (2022). Temperature preferences and detection of *Wolbachia* in *Aedes albopictus* from Santander, Colombia. SSRN.
- Echeverry-ca, E., Lopez, C., Carvajal-, J. D., & Id, O. A. A. (2021). *Potential geographic distribution of the tiger mosquito Aedes albopictus (Skuse , 1894) (Diptera : Culicidae) in current and future conditions for Colombia*. 1–20. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008212>
- Guagliardo, S. A. J., Lee, Y., Pierce, A. A., Wong, J., Chu, Y. Y., Morrison, A. C., Astete, H., Brosi, B., Vazquez-Prokopec, G., Scott, T. W., Kitron, U., & Stoddard, S. T. (2019). The genetic structure of *Aedes aegypti* populations is driven by boat traffic in the Peruvian Amazon. *PLoS Neglected Tropical*

- Diseases*, 13(9), 1–16. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007552>
- Hancock, P. A., & Godfray, H. C. J. (2012). *Modelling the spread of Wolbachia in spatially heterogeneous environments*. *June*, 3045–3054.
- Hancock, P. A., Sinkins, S. P., & Godfray, H. C. J. (2011). Strategies for introducing Wolbachia to reduce transmission of mosquito-borne diseases. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 5(4).
<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001024>
- Hancock, P. A., Sinkins, S. P., Godfray, H. C. J., Hancock, P. A., Sinkins, S. P., & Godfray, H. C. J. (2012). *Population Dynamic Models of the Spread of Wolbachia*. 177(3), 323–333. <https://doi.org/10.1086/658121>
- Hu, Y., Xi, Z., Liu, X., Wang, J., Guo, Y., Ren, D., Wu, H., Wang, X., Chen, B., & Liu, Q. (2020). Identification and molecular characterization of Wolbachia strains in natural populations of *Aedes albopictus* in China. *Parasites and Vectors*, 13(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/s13071-020-3899-4>
- Ismail, N. A., Adilah-Amrannudin, N., Hamsidi, M., Ismail, R., Dom, N. C., Ahmad, A. H., Rahim, S. A., Mohamed, E., Mastuki, M. F., Haron, N., Rambely, A. S., & Camalxaman, S. N. (2021). Natural infestation of wolbachia strains in the populations of ae. Albopictus in subang jaya, Malaysia: A study based on wsp and mitochondrial co1 sequence analysis. *Malaysian Journal of Medicine and Health Sciences*, 17(16), 207–215.
- Joanne, S., Vythilingam, I., Yugavathy, N., Leong, C. S., Wong, M. L., &

- AbuBakar, S. (2015). Distribution and dynamics of Wolbachia infection in Malaysian *Aedes albopictus*. *Acta Tropica*, 148, 38–45.
<https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2015.04.003>
- K. Futami, A. Valderrama, M. Baldi, N. Minakawa, R. M. R. and L. F. C. (2015). *Ae. albopictus*. *Econ. Entomol*, 108(2), 761–768.
- Keeling, M. J., Jiggins, F. M., & Read, J. M. (2003). The invasion and coexistence of competing Wolbachia strains. *Heredity*, 91(4), 382–388.
<https://doi.org/10.1038/sj.hdy.6800343>
- Kim, P., Lim, C., & Voon, K. (2017). Detection of dengue viruses and Wolbachia in *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* larvae from four urban localities in Kuala Lumpur , Detection of dengue viruses and Wolbachia in *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* larvae from four urban localities in Kuala . *Tropical Biomedicine*, September.
- Lucati, F., Delacour, S., Palmer, J. R. B., Caner, J., Oltra, A., Paredes-Esquivel, C., Mariani, S., Escartin, S., Roiz, D., Collantes, F., Bengoa, M., Montalvo, T., Delgado, J. A., Eritja, R., Lucientes, J., Albó Timor, A., Bartumeus, F., & Ventura, M. (2022). Multiple invasions, Wolbachia and human-aided transport drive the genetic variability of *Aedes albopictus* in the Iberian Peninsula. *Scientific Reports*, 12(1), 1–15. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-24963-3>
- Medley, K. A., Jenkins, D. G., & Hoffman, E. A. (2015). Human-aided and

- natural dispersal drive gene flow across the range of an invasive mosquito. *Molecular Ecology*, 24(2), 284–295. <https://doi.org/10.1111/mec.12925>
- Miller, M. J., & Loaiza, J. R. (2015). Geographic Expansion of the Invasive Mosquito *Aedes albopictus* across Panama – Implications for Control of Dengue and Chikungunya Viruses. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 9(1), 1–7. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003383>
- Mohammadi, A., Mostafavi, E., Zaim, M., Enayati, A. A., Basseri, H. R., Mirolyaei, A. R., Poormozafari, J., & Gouya, M. M. (2022). Imported tires; a potential source for the entry of *Aedes* invasive mosquitoes to Iran. *Travel Medicine and Infectious Disease*, 49, 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.tmaid.2022.102389>
- Mohanty, I., Rath, A., Pradhan, N., Panda, B. B., Mohapatra, P. K., & Hazra, R. K. (2021). Prevalence and transmission potential of *Wolbachia* in *Aedes albopictus* population circulating in endemic coastal districts of Odisha, India. *J Vector Borne Dis*, December, 297–305.
- Moore, C. G. (1999). *Aedes albopictus* in the United States: Current status and prospects for further spread. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 15(2), 221–227.
- Müller, P., Engeler, L., Vavassori, L., Suter, T., Guidi, V., Gschwind, M., Tonolla, M., & Flacio, E. (2020). Surveillance of invasive *aedes* mosquitoes along swiss traffic axes reveals different dispersal modes for *aedes*

- albopictus and ae. Japonicus. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 14(9), 1–20.
<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008705>
- Noor Afizah, A., Roziah, A., Nazni, W. A., & Lee, H. L. (2015). Detection of Wolbachia from field collected Aedes albopictus Skuse in Malaysia. *Indian Journal of Medical Research*, 142(AUGUST), 205–210.
<https://doi.org/10.4103/0971-5916.164259>
- Parks, W., Lloyd, L., Mundial, O., La, D. E., Organización, S., De, P., & Ginebra, L. S. (2017). *Planificación de la movilización y comunicación social para la prevención y el control del dengue GUÍA PASO A PASO*. 1–200.
https://www.who.int/tdr/publications/documents/planificacion_dengue.pdf
- Puerta-Guardo, H., Contreras-Perera, Y., Perez-Carrillo, S., Che-Mendoza, A., Ayora-Talavera, G., Vazquez-Prokopec, G., Martin-Park, A., Zhang, D., & Manrique-Saide, P. (2020). Wolbachia in native populations of aedes albopictus (Diptera: Culicidae) from Yucatan Peninsula, Mexico. *Journal of Insect Science*, 20(5), 1–7. <https://doi.org/10.1093/jisesa/ieaa096>
- Ruiza, A., Gladys Gutiérrez-Bugalloa, Rosmari Rodríguez-Rocheb, L., Pérezb, González-Brochea, R., Piedraa, L. A., Martíneza, L. C., Menéndeza, Z., Vega-Rúac, A., & Bisset, J. A. (2022). First report of natural Wolbachia infections in mosquitoes from Cuba. *SSRN*, 1–14.
- Schaffner, F., & Karch, S. (2000). Première observation d’Aedes albopictus

- (Skuse, 1894) en France métropolitaine. *Comptes Rendus de l'Académie Des Sciences - Series III - Sciences de La Vie*, 323(4), 373–375.
[https://doi.org/10.1016/s0764-4469\(00\)00143-8](https://doi.org/10.1016/s0764-4469(00)00143-8)
- Schmidt, T. L., Filipović, I., Hoffmann, A. A., & Rašić, G. (2018). Fine-scale landscape genomics helps explain the slow spatial spread of *Wolbachia* through the *Aedes aegypti* population in Cairns, Australia. *Heredity*, 120(5), 386–395. <https://doi.org/10.1038/s41437-017-0039-9>
- Swan, T., Russell, T. L., Staunton, K. M., Field, M. A., Ritchie, S. A., & Burkot, T. R. (2022). A literature review of dispersal pathways of *Aedes albopictus* across different spatial scales: implications for vector surveillance. *Parasites & Vectors*, 15(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/s13071-022-05413-5>
- Tsai, K. H., Lien, J. C., Huang, C. G., Wu, W. J., & Chen, W. J. (2004). Molecular (Sub) grouping of endosymbiont *Wolbachia* infection among mosquitoes of Taiwan. *Journal of Medical Entomology*, 41(4), 677–683.
<https://doi.org/10.1603/0022-2585-41.4.677>
- Wiwatanaratnabutr, I., & Kittayapong, P. (2009). Effects of crowding and temperature on *Wolbachia* infection density among life cycle stages of *Aedes albopictus*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 102(3), 220–224.
<https://doi.org/10.1016/j.jip.2009.08.009>
- Zhou, W., Rousset, F., & O'Neill, S. (1998). Phylogeny and PCR-based classification of *Wolbachia* strains using *wsp* gene sequences. *Proceedings of*

the Royal Society B: Biological Sciences, 265(1395), 509–515.

<https://doi.org/10.1098/rspb.1998.0324>

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

Alonso, A. C., Stein, M., Hisgen, C. M., & Micieli, M. V. (2022). Abiotic factors affecting the prevalence of *Wolbachia* (Rickettsiaceae) in immature *Aedes albopictus* (Skuse) (Culicidae). *Journal of Invertebrate Pathology*, 189(107730). <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jip.2022.107730>

Anoopkumar, A. N., Puthur, S., Varghese, P., Rebello, S., & Aneesh, E. M. (2017). Life cycle, bio-ecology and DNA barcoding of mosquitoes *aedes aegypti* (Linnaeus) and *aedes albopictus* (Skuse). *Journal of Communicable Diseases*, 49(3), 32–41. <https://doi.org/10.24321/0019.5138.201719>

Armbruster, P., Damsky, W. E., Giordano, R., Birungi, J., Munstermann, L. E., & Conn, J. E. (2003). Infection of New- and Old-World *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) by the Intracellular Parasite *Wolbachia*: Implications for Host Mitochondrial DNA Evolution. *Journal of Medical Entomology*, 40(3), 356–360. <https://doi.org/10.1603/0022-2585-40.3.356>

Baldo, L., Hotopp, J. C. D., Jolley, K. A., Bordenstein, S. R., Biber, S. A., Choudhury, R. R., Hayashi, C., Maiden, M. C. J., Tettelin, H., & Werren, J.

- H. (2006). Multilocus sequence typing system for the endosymbiont *Wolbachia pipientis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(11), 7098–7110. <https://doi.org/10.1128/AEM.00731-06>
- Bartlett-Healy, K., Unlu, I., Obenauer, P., Hughes, T., Healy, S., Crepeau, T., Farajollahi, A., Kesavaraju, B., Fonseca, D., Schoeler, G., Gaugler, R., & Strickman, D. (2012). Larval mosquito habitat utilization and community dynamics of *aedes albopictus* and *aedes japonicus* (Diptera: Culicidae). *Journal of Medical Entomology*, 49(4), 813–824. <https://doi.org/10.1603/ME11031>
- Bazzocchi, C., Jamnongluk, W., Neill, S. L. O., Anderson, T. J. C., Genchi, C., & Bandi, C. (2000). *wsp* Gene Sequences from the *Wolbachia* of Filarial Nematodes. 41, 96–100. <https://doi.org/10.1007/s002840010100>
- Benedict, M. Q., Levine, R. S., Hawley, W. A., & Lounibos, L. P. (2007). Spread of the tiger: Global risk of invasion by the mosquito *Aedes albopictus*. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 7(1), 76–85. <https://doi.org/10.1089/vbz.2006.0562>
- Bennett, K. L., Gómez-Martínez, C., Chin, Y., Saltonstall, K., McMillan, W. O., Rovira, J. R., & Loaiza, J. R. (2019). Dynamics and diversity of bacteria associated with the disease vectors *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. *Scientific Reports*, 9(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-48414-8>
- Bennett, K. L., Gómez Martínez, C., Almanza, A., Rovira, J. R., McMillan, W. O.,

- Enriquez, V., Barraza, E., Diaz, M., Sanchez-Galan, J. E., Whiteman, A., Gittens, R. A., & Loaiza, J. R. (2019). High infestation of invasive *Aedes* mosquitoes in used tires along the local transport network of Panama. *Parasites and Vectors*, 12(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/s13071-019-3522-8>
- Bian, G., Xu, Y., Lu, P., Xie, Y., & Xi, Z. (2010). The endosymbiotic bacterium *Wolbachia* induces resistance to dengue virus in *Aedes aegypti*. *PLoS Pathogens*, 6(4), 1–10. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000833>
- Birungi, J., & Munstermann, L. E. (2002). Genetic structure of *Aedes albopictus* (diptera: Culicidae) populations based on mitochondrial ND5 sequences: Evidence for an independent invasion into Brazil and United States. *Annals of the Entomological Society of America*, 95(1), 130–132. [https://doi.org/10.1603/0013-8746\(2002\)095\[0125:gsoaad\]2.0.co;2](https://doi.org/10.1603/0013-8746(2002)095[0125:gsoaad]2.0.co;2)
- Blagrove, M. S. C., Arias-Goeta, C., Failloux, A. B., & Sinkins, S. P. (2012). *Wolbachia* strain wMel induces cytoplasmic incompatibility and blocks dengue transmission in *Aedes albopictus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(1), 255–260. <https://doi.org/10.1073/pnas.1112021108>
- Britton, H. H. N. F. (2013). *Modelling the Use of Wolbachia to Control Dengue Fever Transmission*. 796–818. <https://doi.org/10.1007/s11538-013-9835-4>
- Bull, J. J., & Turelli, M. (2013). *Wolbachia versus dengue Evolutionary forecasts*. 197–

207. <https://doi.org/10.1093/emph/eot018>
- C. Liew, & C.F.Curtis. (2004). *Horizontal and vertical dispersal of dengue vector mosquitoes , Aedes aegypti and Aedes albopictus , in Singapore.* 351–360.
- Caputo, B., Moretti, R., Manica, M., Serini, P., Lampazzi, E., Bonanni, M., Fabbri, G., Pichler, V., & Calvitti, M. (2019). *A bacterium against the tiger : preliminary evidence of fertility reduction after release of Aedes albopictus males with manipulated Wolbachia infection in an Italian urban area.* May.
<https://doi.org/10.1002/ps.5643>
- Chuchuy, A., Rodriguero, M. S., Ferrari, W., Ciota, A. T., Kramer, L. D., & Micieli, M. V. (2018). Biological characterization of Aedes albopictus (Diptera : Culicidae) in Argentina : implications for arbovirus transmission. *Scuential Report, March*, 1–8. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-23401-7>
- Claridge, J. E. (2004). Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases. *Clinical Microbiology Reviews*, 17(4), 840–862.
<https://doi.org/10.1128/CMR.17.4.840-862.2004>
- Das, B., Satapathy, T., Kar, S. K., & Hazra, R. K. (2014). Genetic structure and Wolbachia genotyping in naturally occurring populations of Aedes albopictus across contiguous landscapes of Orissa, India. *PLoS ONE*, 9(4).
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0094094>
- Díaz-Nieto, L. M., Macía, A., Perotti, M. A., & Bero, C. M. (2013). *Geographical*

- Limits of the Southeastern Distribution of Aedes aegypti (Diptera, Culicidae) in Argentina.* 7(1), 1–6. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001963>
- Dobson, S. L., Bourtzis, K., Braig, H. R., & Jones, B. F. (1999). *Wolbachia infections are distributed throughout insect somatic and germ line tissues.* 29, 153–160.
- Dobson, S. L., Marsland, E. J., & Rattanadechakul, W. (2009). *Wolbachia*-Induced Cytoplasmic Incompatibility in Single- and Superinfected *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae). *Journal of Medical Entomology*, 38(3), 382–387. <https://doi.org/10.1603/0022-2585-38.3.382>
- Duque-Granda, D., Posada-Mejía, J. A., Velez-Quiroz, M. A., Cadavid-Restrepo, G., Moreno-Herrera, C. X., & Gómez, R. J. V. (2022). Temperature preferences and detection of *Wolbachia* in *Aedes albopictus* from Santander, Colombia. SSRN.
- Duron, O., Bernard, C., Unal, S., & Berthomieu, A. (2006). *Tracking factors modulating cytoplasmic incompatibilities in the mosquito Culex pipiens.* 3061–3071. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2006.02996.x>
- Dutton, T. J., & Sinkins, S. P. (2004). *Strain-specific quantification of Wolbachia density in Aedes albopictus and effects of larval rearing conditions.* 13, 317–322.
- Echeverry-ca, E., Lopez, C., Carvajal-, J. D., & Id, O. A. A. (2021). *Potential geographic distribution of the tiger mosquito Aedes albopictus (Skuse, 1894) (Diptera: Culicidae) in current and future conditions for Colombia.* 1–20.

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008212>

Edwards, B., Ghedin, E., Voronin, D., Edwards, B., Ghedin, E., & Voronin, D.

(2023). *cholesterol metabolism in mosquito cells*. 11(6).

Eritja, R., Palmer, J. R. B., Roiz, D., Sanpera-Calbet, I., & Bartumeus, F. (2017).

Direct Evidence of Adult *Aedes albopictus* Dispersal by Car. *Scientific Reports*, 7(1), 1–15. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-12652-5>

Goubert, C., Minard, G., Vieira, C., & Boulesteix, M. (2016). Population genetics

of the Asian tiger mosquito *Aedes albopictus*, an invasive vector of human diseases. *Heredity*, 117(3), 125–134. <https://doi.org/10.1038/hdy.2016.35>

Guagliardo, S. A. J., Lee, Y., Pierce, A. A., Wong, J., Chu, Y. Y., Morrison, A. C.,

Astete, H., Brosi, B., Vazquez-Prokopec, G., Scott, T. W., Kitron, U., &

Stoddard, S. T. (2019). The genetic structure of *Aedes aegypti* populations is driven by boat traffic in the Peruvian Amazon. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 13(9), 1–16. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007552>

Guo, Y., Guo, J., & Li, Y. (2022). *Wolbachia w Pip Blocks Zika Virus Transovarial*

Transmission in.

Hancock, P. A., & Godfray, H. C. J. (2012). Modelling the spread of *Wolbachia*

in spatially heterogeneous environments. *Journal of the Royal Society Interface*, 9(76), 3045–3054. <https://doi.org/10.1098/rsif.2012.0253>

Harrington, L. C., Scott, T. W., Lerdthusnee, K., Coleman, R. C., Costero, A.,

Clark, G. G., Jones, J. J., Kitthawee, S., Kittayapong, P., Sithiprasasna, R., &

- Edman, J. D. (2005). Dispersal of the dengue vector *Aedes aegypti* within and between rural communities. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 72(2), 209–220. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2005.72.209>
- Hien, N. T., Anh, D. D., Le, N. H., Yen, N. T., Phong, T. V, Nam, V. S., Duong, T. N., Nguyen, N. B., Huong, D. T. T., Hung, L. Q., Trinh, C. N. T., Hoang, N. V, Mai, V. Q., Nghia, L. T., Dong, N. T., Tho, L. H., Kutcher, S., Hurst, T. P., Montgomery, J. L., ... Ryan, P. A. (2022). *Environmental factors influence the local establishment of Wolbachia in Aedes aegypti mosquitoes in two small communities in central Vietnam [version 2 ; peer review : 2 approved] Gates Open Research. May.*
- Honório, N. A., Da Costa Silva, W., Leite, P. J., Gonçalves, J. M., Lounibos, L. P., & Lourenço-de-Oliveira, R. (2003). Dispersal of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in an Urban Endemic Dengue Area in the State of Rio de Janeiro, Brazil. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 98(2), 191–198. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762003000200005>
- Hu, Y., Xi, Z., Liu, X., Wang, J., Guo, Y., Ren, D., Wu, H., Wang, X., Chen, B., & Liu, Q. (2020). Identification and molecular characterization of *Wolbachia* strains in natural populations of *Aedes albopictus* in China. *Parasites and Vectors*, 13(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/s13071-020-3899-4>
- Huang, E. Y. Y., Wong, A. Y. P., Lee, I. H. T., Qu, Z., Yip, H. Y., Leung, C., Yin, S., & Hui, J. H. L. (2020). Infection patterns of dengue , Zika and

- endosymbiont Wolbachia in the mosquito *Aedes albopictus* in Hong Kong. *Parasites & Vectors*, 1–10. <https://doi.org/10.1186/s13071-020-04231-x>
- Huey, R. B. (1979). *Integrating Thermal Physiology and Ecology of Ectotherms: A Discussion of Approaches*. 366, 357–366.
- Hull, W. B. (1958). Mosquito survey of Guam. *United States Armed Forces Medical Journal*, 3(9), 1287-95.
- Hurst, G. D. D., Johnson, A. P., & Fuyama, Y. (2000). *Male-Killing Wolbachia in Drosophila : A Temperature-Sensitive Trait With a Threshold Bacterial Density*. 1970.
- Ib, A., Smitz, N., Hartog, W. Den, Vossenbergh, B. Van De, Wolf, K. De, Deblauwe, I., Bortel, W. Van, & Jacobs, F. (2020). *Detection of Exotic Mosquito Species (Diptera : Culicidae) at International Airports in Europe*.
- Jin, S., Fan, J., Cao, H., Zhang, Z., Leng, P., & Gao, Q. (2023). Vertical dispersal of *Aedes albopictus* within multi - story buildings in downtown. *Parasites & Vectors*, 1–11. <https://doi.org/10.1186/s13071-023-05732-1>
- Joanne, S., Vythilingam, I., Teoh, B., Leong, C., Tan, K., & Wong, M. (2017). *Vector competence of Malaysian Aedes albopictus with and without Wolbachia to four dengue virus serotypes*. 22(9), 1154–1165. <https://doi.org/10.1111/tmi.12918>
- Joanne, S., Vythilingam, I., Yugavathy, N., Leong, C. S., Wong, M. L., & AbuBakar, S. (2015). Distribution and dynamics of Wolbachia infection in

- Malaysian *Aedes albopictus*. *Acta Tropica*, 148, 38–45.
<https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2015.04.003>
- Kaur, R., Shropshire, J. D., Cross, K. L., Leigh, B., Mansueto, A. J., Stewart, V., Bordenstein, S. R., & Bordenstein, S. R. (2021). Review Living in the endosymbiotic world of *Wolbachia* : A centennial review. *Cell Host and Microbe*, 29(6), 879–893. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2021.03.006>
- Kim, P., Lim, C., & Voon, K. (2017). Detection of dengue viruses and *Wolbachia* in *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* larvae from four urban localities in Kuala Lumpur , Detection of dengue viruses and *Wolbachia* in *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* larvae from four urban localities in Kuala . *Tropical Biomedicine*, September.
- Kittayapong, P., Baimai, V., & O'Neill, S. L. (2002). Field prevalence of *Wolbachia* in the mosquito vector *Aedes albopictus*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 66(1), 108–111.
<https://doi.org/10.4269/ajtmh.2002.66.108>
- Kotsakiozi, P., Richardson, J. B., Pichler, V., Favia, G., Martins, A. J., Urbanelli, S., Armbruster, P. A., & Caccone, A. (2017). Population genomics of the Asian tiger mosquito, *Aedes albopictus*: insights into the recent worldwide invasion. *Ecology and Evolution*, 7(23), 10143–10157.
<https://doi.org/10.1002/ece3.3514>
- Kulkarni, A., Yu, W., Jiang, J., Sanchez, C., Karna, A. K., Martinez, K. J. L.,

- Hanley, K. A., Buenemann, M., Hansen, I. A., Xue, R. de, Ettestad, P., Melman, S., Duguma, D., Debboun, M., & Xu, J. (2019). *Wolbachia pipientis* occurs in *Aedes aegypti* populations in New Mexico and Florida, USA. *Ecology and Evolution*, 9(10), 6148–6156. <https://doi.org/10.1002/ece3.5198>
- Lacroix, R., Delatte, H., Hue, T., & Reiter, P. (2009). Dispersal and survival of male and female *aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) on réunion Island. *Journal of Medical Entomology*, 46(5), 1117–1124. <https://doi.org/10.1603/033.046.0519>
- Leta, S., Jibat, T., Clercq, E. M. De, Amenu, K., Kraemer, M. U. G., & Revie, C. W. (2018). International Journal of Infectious Diseases Global risk mapping for major diseases transmitted by *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. *International Journal of Infectious Diseases*, 67, 25–35. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2017.11.026>
- Lounibos, L. P. (2002). INVASIONS BY INSECT VECTORS OF HUMAN DISEASE. *Annu. Rev. Entomol.* 2002., 47:233–66.
- Manni, M., Guglielmino, C. R., Scolari, F., Vega-Rúa, A., Failloux, A. B., Somboon, P., Lisa, A., Savini, G., Bonizzoni, M., Gomulski, L. M., Malacrida, A. R., & Gasperi, G. (2017). Genetic evidence for a worldwide chaotic dispersion pattern of the arbovirus vector, *Aedes albopictus*. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 11(1). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005332>

- Metcalf, J. A., Bordenstein, S. R., On, J., Perlmutter, J. I., Shropshire, J. D., Layton, E. M., Funkhouser-jones, L. J., Beckmann, J. F., & Bordenstein, S. R. (2017). Prophage WO genes recapitulate and enhance Wolbachia-induced cytoplasmic incompatibility. *Nature Publishing Group*.
<https://doi.org/10.1038/nature21391>
- Miller, M. J., & Loaiza, J. R. (2015). Geographic Expansion of the Invasive Mosquito *Aedes albopictus* across Panama – Implications for Control of Dengue and Chikungunya Viruses. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 9(1), 1–7. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003383>
- Misailidis, M., Kotsiou, N., Aristotelis Moulisanos, Gewehr, S., Papakostas, A. A. S., Drosopoulou, S., & Elena. (2024). *The Molecular Detection, Characterization, and Temperature Dependence of Wolbachia Infections in Field Populations of Aedes albopictus (Diptera: Culicidae) Mosquitoes in Greece*. 1–13.
- Mogi, M., Armbruster, P., Tuno, N., Campos, R., & Eritja, R. (2015). Simple Indices Provide Insight to Climate Attributes Delineating the Geographic Range of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) Prior to Worldwide Invasion. *Journal of Medical Entomology*, 52(4), 647–657.
<https://doi.org/10.1093/jme/tjv038>
- Mohanty, I., Rath, A., Pradhan, N., Panda, B. B., Mohapatra, P. K., & Hazra, R. K. (2021). Prevalence and transmission potential of Wolbachia in *Aedes albopictus* population circulating in endemic coastal districts of Odisha ,

- India. *J Vector Borne Dis*, December, 297–305.
- Moo-llanes, D. A., Teresa, L., Torres-moniz, J. A., Mosso-gonz, C., Casas-mart, M., & Samy, A. M. (2021). *Assessing the Potential Distributions of the Invasive Mosquito Vector Aedes albopictus and Its Natural Wolbachia Infections in México*. Skuse 1894.
- Moore, C. G. (1999). *Aedes albopictus* in the United States: Current status and prospects for further spread. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 15(2), 221–227.
- Mousson, L., Zouache, K., Arias-Goeta, C., Raquin, V., Mavingui, P., & Failloux, A. B. (2012). The Native Wolbachia Symbionts Limit Transmission of Dengue Virus in *Aedes albopictus*. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 6(12).
<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001989>
- Müller, P., Engeler, L., Vavassori, L., Suter, T., Guidi, V., Gschwind, M., Tonolla, M., & Flacio, E. (2020). Surveillance of invasive aedes mosquitoes along swiss traffic axes reveals different dispersal modes for aedes albopictus and ae. Japonicus. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 14(9), 1–20.
<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008705>
- Noor Afizah, A., Roziah, A., Nazni, W. A., & Lee, H. L. (2015). Detection of Wolbachia from field collected *Aedes albopictus* Skuse in Malaysia. *Indian Journal of Medical Research*, 142(AUGUST), 205–210.
<https://doi.org/10.4103/0971-5916.164259>

- Pan, X., Pike, A., Joshi, D., Bian, G., McFadden, M. J., Lu, P., Liang, X., Zhang, F., Raikhel, A. S., & Xi, Z. (2018). The Pan, Xiaoling, Andrew Pike, Deepak Joshi, Guowu Bian, Michael J. McFadden, Peng Lu, Xiao Liang, Fengrui Zhang, Alexander S. Raikhel, and Zhiyong Xi. 2018. "The Bacterium Wolbachia Exploits Host Innate Immunity to Establish a Symbiotic Relationship with. *ISME Journal*, 12(1), 277-288.
<https://doi.org/10.1038/ismej.2017.174>
- Park, C. H., Lim, H. W., Kim, H. W., Lee, W. G., Roh, J. Y., Park, M. Y., & Shin, E. H. (2016). High prevalence of Wolbachia infection in Korean populations of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae). *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 19(1), 191-194. <https://doi.org/10.1016/j.aspen.2015.12.014>
- Patterson, J. (2016). *Western Journal of Emergency Medicine : Integrating Emergency Care with Population Health Dengue , Zika and Chikungunya : Emerging Arboviruses in the New World*.
<https://doi.org/10.5811/westjem.2016.9.30904>
- Porter, J., & Sullivan, W. (2023). *The cellular lives of Wolbachia*. July.
<https://doi.org/10.1038/s41579-023-00918-x>
- Puerta-Guardo, H., Contreras-Perera, Y., Perez-Carrillo, S., Che-Mendoza, A., Ayora-Talavera, G., Vazquez-Prokopec, G., Martin-Park, A., Zhang, D., & Manrique-Saide, P. (2020). Wolbachia in native populations of *aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) from Yucatan Peninsula, Mexico. *Journal of*

- Insect Science*, 20(5), 1–7. <https://doi.org/10.1093/jisesa/ieaa096>
- Reinert, J. F., Harbach, R. E., & Kitching, I. A. N. J. (2009). *Phylogeny and classification of tribe Aedini (Diptera : Culicidae)*. 700–794.
<https://doi.org/10.1111/j.1096-3642.2009.00570.x>
- Rigaud, T., & Juchault, P. (1992). *Genetic control of the vertical transmission of a cytoplasmic sex factor in Armadillidium vulgare Latr. (Crustacea, Oniscidea)*. 68(February 1991), 47–52.
- Rios, L., & Maruniak, J. (2004). Asian tiger mosquito - *Aedes albopictus* (Skuse). *University of Florida - Entomology & Nematology*, 2–5.
http://entnemdept.ufl.edu/creatures/aquatic/asian_tiger.htm
- Rodriguero, M. S. (2013). *una pandemia con posibilidades RODRIGUERO, Marcela S.* 5680, 117–137.
- Roiz, D., Eritja, R., Escosa, R., Lucientes, J., Marquès, E., Melero-Alcíbar, R., Ruiz, S., & Molina, R. (2007). A survey of mosquitoes breeding in used tires in Spain for the detection of imported potential vector species. *Journal of Vector Ecology*, 32(1), 10–15. [https://doi.org/10.3376/1081-1710\(2007\)32\[10:asombi\]2.0.co;2](https://doi.org/10.3376/1081-1710(2007)32[10:asombi]2.0.co;2)
- Rossi, G., & Almirón, W. (2013). *Clave ilustrada para la identificación de larvas de mosquitos de interés sanitario encontradas en criaderos artificiales en la Argentina Contenido.*
- Ruben, B. M., Domínguez-santos, R., Garrote-sánchez, E., Marcilla, A., & Gil, R.

- (2023). *Infecciones por Wolbachia pipientis en poblaciones de Aedes albopictus en la ciudad de València (España): implicaciones para el control de mosquitos.*
- Rueda, L. M. (2004). *Zootaxa* 589.
- Ruiza, A., , Gladys Gutiérrez-Bugalloa, Rosmari Rodríguez-Rocheb, L., Pérezb, González-Brochea, R., Piedraa, L. A., Martíneza, L. C., Menéndeza, Z., Vega-Rúac, A., & Bisset, J. A. (2022). First report of natural Wolbachia infections in mosquitoes from Cuba. *SSRN*, 1–14.
- Saitou, N., & Nei, M. (1987). ESCALA CIWA-AR Escala CIWA-Ar(Clinical Institute Withdrawal Assesment for Alcohol) Evaluación del Síndrome de Abstinencia Alcohólica. *Mol. Biol. Evol*, 4(4), 406–425.
- Sanders, J. D., Talley, J. L., Frazier, A. E., & Noden, B. H. (2020). Landscape and anthropogenic factors associated with adult aedes aegypti and aedes albopictus in small cities in the southern great plains. *Insects*, 11(10), 1–20.
<https://doi.org/10.3390/insects11100699>
- Saucereau, Y., Moro, C. V., Dieryckx, C., Dupuy, J., Tran, F., Girard, V., Potier, P., & Mavingui, P. (2017). *Comprehensive proteome profiling in Aedes albopictus to decipher Wolbachia- arbovirus interference phenomenon.* 1–14.
<https://doi.org/10.1186/s12864-017-3985-y>
- Schultz, M. J., Isern, S., Michael, S. F., Corley, R. B., Connor, J. H., & Frydman, M. (2017). *crossm Variable Inhibition of Zika Virus Replication by Different Wolbachia Strains in Mosquito Cell Cultures.*

- Service, M. W., & Place, P. (1997). *Mosquito (Diptera : Culicidae) Dispersal – The Long and Short of It*. 34(6), 579–588.
- Sherpa, S., Rioux, D., Pougnet-lagarde, C., & Després, L. (2017). Genetic diversity and distribution differ between long-established and recently introduced populations in the invasive mosquito *Aedes albopictus*. *Infection, Genetics and Evolution*.
<https://doi.org/10.1016/j.meegid.2017.12.018>
- Simões, P. M., Mialdea, G., Reiss, D., Sagot, M. F., & Charlat, S. (2011). Wolbachia detection: An assessment of standard PCR Protocols. *Molecular Ecology Resources*, 11(3), 567–572. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2010.02955.x>
- Stouthamerff, R., & Kazmert, D. J. (1994). *Cytogenetics of microbe-associated parthenogenesis and its consequences for gene flow in Trichogramma wasps*. 73(February), 317–327.
- Swan, T., Russell, T. L., Staunton, K. M., Field, M. A., Ritchie, S. A., & Burkot, T. R. (2022). A literature review of dispersal pathways of *Aedes albopictus* across different spatial scales: implications for vector surveillance. *Parasites & Vectors*, 15(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/s13071-022-05413-5>
- Trájer, A., Hammer, T., Kacsala, I., Tánzos, B., Bagi, N., & Padisák, J. (2017). *Decoupling of active and passive reasons for the invasion dynamics of Aedes albopictus Skuse (Diptera : Culicidae): Comparisons of dispersal history in the*

Apennine and Florida peninsulas. 42(2), 233–242.

<https://doi.org/10.1111/jvec.12263>

Tram, U., & Sullivan, W. (2002). Role of delayed nuclear envelope breakdown and mitosis in Wolbachia-induced cytoplasmic incompatibility. *Science*, 296(5570), 1124–1126. <https://doi.org/10.1126/science.1070536>

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

Vavassori, L., Saddler, A., & Müller, P. (2019). Active dispersal of *Aedes albopictus*: A mark-release-recapture study using self-marking units. *Parasites and Vectors*, 12(1), 1–14. [https://doi.org/10.1186/s13071-019-3837-](https://doi.org/10.1186/s13071-019-3837-5)

5

Verdonschot, P. F. M., & Besse-lototskaya, A. A. (2014). Limnological Flight distance of mosquitoes (Culicidae): A metadata analysis to support the management of barrier zones around rewetted and newly constructed wetlands. *Limnologia*, 45, 69–79.

<https://doi.org/10.1016/j.limno.2013.11.002>

Vinayagam, S., Nirmolia, T., Chetry, S., Kumar, N. P., Saini, P., Bhattacharyya, D. R., Bhowmick, I. P., Sattu, K., & Patgiri, S. J. (2023). *Molecular Evidence of*

Wolbachia Species in Wild-Caught Aedes albopictus and Aedes aegypti Mosquitoes in Four States of Northeast India. 2023.

- Walker, T., Johnson, P. H., Moreira, L. A., Iturbe-Ormaetxe, I., Frentiu, F. D., McMeniman, C. J., Leong, Y. S., Dong, Y., Axford, J., Kriesner, P., Lloyd, A. L., Ritchie, S. A., O'Neill, S. L., & Hoffmann, A. A. (2011). The wMel Wolbachia strain blocks dengue and invades caged *Aedes aegypti* populations. *Nature*, 476(7361), 450–455.
<https://doi.org/10.1038/nature10355>
- Werren, J. H., Baldo, L., & Clark, M. E. (2008). Wolbachia: Master manipulators of invertebrate biology. *Nature Reviews Microbiology*, 6(10), 741–751.
<https://doi.org/10.1038/nrmicro1969>
- Ye, Y. H., Carrasco, A. M., Dong, Y., Sgrò, C. M., & McGraw, E. A. (2016). The effect of temperature on Wolbachia-mediated dengue virus blocking in *Aedes aegypti*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 94(4), 812–819. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.15-0801>
- Zhou, W., Rousset, F., & O'Neill, S. (1998). Phylogeny and PCR-based classification of Wolbachia strains using wsp gene sequences. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 265(1395), 509–515.
<https://doi.org/10.1098/rspb.1998.0324>
- Zug, R., & Hammerstein, P. (2012). *Still a Host of Hosts for Wolbachia : Analysis of Recent Data Suggests That 40 % of Terrestrial Arthropod Species Are Infected.* 7(6), 7–9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0038544>