SIBIUP
Biblioteca Int Simon Bolivar
00330571

UNIVERSIDAD DE PANAMA

VICERRECTORIA DE INVESTIGACION Y POSTGRADO

PROGRAMA CENTROAMERICANO DE MAESTRIA EN ENTOMOLOGIA

DINAMICA DEL HABITAT LARVAL E INTERACCION ECOLOGICA DE *Aedes aegypti* Y *Aedes albopictus* EN AMBIENTES ANTROPICOS DE PANAMA

POR

CARMELO GOMEZ MARTINEZ

2017

DINÁMICA DEL HÁBITAT LARVAL E INTERACCIÓN ECOLÓGICA DE *Aedes aegypti* Y *Aedes albopictus* EN AMBIENTES ANTRÓPICOS DE PANAMÁ

TESIS

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

10 MAY 2010

VICE-RRECTORÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSTGRADO

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

APROBADO

_____ Asesor

_____ Jurado

_____ Jurado

AGRADECIMIENTOS

No habría podido realizar este trabajo sin el esfuerzo conjunto de excelentes personas que me apoyaron tanto de forma continua como temporal

En primer lugar agradezco a los miembros del *Mosquito Team* variopinto grupo de personas unidas por su amor/odio hacia los mosquitos El Doctor Jose Loaiza por la fe puesta en mi su apoyo enseñanzas y asesoramiento fueron necesarios para que este trabajo llegase a buen puerto el excelentísimo Jose Ricardo Rovira maestro en mosquitos y otras artes de la vida la Doctora Kelly L Bennett por su inestimable apoyo en el campo y en laboratorio su paciencia británica y las enseñanzas recíprocas de idiomas el Licenciado Alejandro Almanza por su apoyo en el campo su experticia en MALDI TOF y su ayuda en estos tres años de inmigrante Vanessa Enriquez Elia L Barraza Evon Magnusson Marcela Diaz Kaitlin Driesse y Jaime Cerro por su apoyo en el trabajo de campo en sus visitas a Panamá

Varias personas de Smithsonian en el laboratorio de Biología Molecular de Naos ayudaron de una manera u otra con el trabajo de campo y laboratorio La Doctora Kristin Saltonstall y M Sc Yamileth Chin por su apoyo en el laboratorio de la comunidad microbiana las Licenciadas Eyda Gomez y Carolina Boutin por su ayuda en la logística y en todo lo que se nos ocurriera

En INDICASAT el Doctor Rolando Gittens la M Sc Arelys L Fuentes y el M Sc Juan Camilo Rojas por su apoyo con la espectrometría de masas por MALDI TOF Hicieron un trabajo excelente pese a que finalmente esta parte del trabajo haya quedado fuera de este manuscrito La Licenciada Yamibel Díaz y el resto de personal administrativo por toda su ayuda

En el Programa Centroamericano de Maestria en Entomologia debo agradecer al profesorado que de una manera u otra contribuyo a mi educacion como entomologo asi como a la Licenciada Vickelda Perez por su ayuda administrativa En especial agradecer al Doctor Enrique Medianero y al M Sc Percis Garces por su asesoramiento y correccion de este manuscrito Al resto de mis companeros de clase Tomas Rios Ernesto Bonadies y Pamela Polanco por el apoyo y las pintas compartidas estos anos Tambien a mis buenas amigas Ana Cecilia y Candy por hacer de mi ultimo año en Panama mas llevadero

Agradecer tambien a la Secretaria Nacional de Ciencia Tecnologia e Innovacion de Panama (SENACYT) por la financiacion y el apoyo al proyecto

Por ultimo pero no menos importante deseo agradecer al programa de becas FELLOW MUNDUS y todo su equipo asi como a la Universidade Nova de Lisboa por darme la oportunidad de vivir una maravillosa experiencia en el tropico gracias a la cual he obtenido la experiencia necesaria para continuar mi carrera como cientifico

INDICE GENERAL

AGRADECIMIENTOS iii

INDICE GENERAL vi

INDICE DE FIGURAS v

INDICE DE CUADROS ix

RESUMEN 1

SUMMARY 2

INTRODUCCION 3

CAPITULO I Influencia de la físico química del habitat larval y la composición bacteriana en *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus* en ambientes antropicos de Panama

1.1 Marco teorico

1.1.1 Determinantes ambientales del habitat larval 9

1.1.1.1 Temperatura 9

1.1.1.2 pH 10

1.1.1.3 Comunidad bacteriana 11

1.2 Objetivos 15

1.3 Material y metodos

1.3.1 Recolecta activa de estadios inmaduros y toma de datos 16

1.3.2 Cria y manejo de especimenes en laboratorio 16

1.3.3 Extraccion de ADN y creacion de librerias del gen 16S 17

1.3.4 Analisis de la comunidad bacteriana 19

1.3.5 Analisis de la temperatura y el pH 20

1.4 Resultados

1.4.1 Analisis de Temperatura y pH 22

1.4.2 Analisis de correlacion y modelos de regresion logistica 22

1.4.3 Analisis de la comunidad bacteriana 24

1.4.3.1 *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus* 26

1.4.3.2 Residencias y Talleres 27

1.4.3.3 Tipo de criadero 29

1.4.3.4 Larva y adulto 30

1.4.3.5 Temperatura y PH 33

CAPITULO II Asociacion de *Aedes aegypti y Aedes* albopictus con talleres para la compra y venta de llantas usadas en Panama

2.1 Marco teorico

2.1.1 Patrones de migracion natural 36

2.1.2 Migracion de *Aedes* asistida por humanos 38

2.2 Objetivos 41

2.3 Material y metodos

2.3.1 Recolecta de mosquitos con ovitrampas 42

2.3.2 Cria y manejo de especimenes en laboratorio 43

2.3.3 Analisis de co ocurrencia 44

2.4 Resultados 45

2.4.1 Analisis de co ocurrencia 47

CAPITULO III Discusion conclusiones y perspectivas de futuro

3.1 Discusion 49

5.1.1 Variables físico químicas del habitat larval 49
5.1.2 Composición bacteriana 50
5.1.3 *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus* en talleres 55
5.2 Conclusiones y recomendaciones 57

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS 60

ANEXO I FIGURAS 77

ANEXO II CUADROS 88

INDICE DE FIGURAS

Figura 1	Mapa de los sitios de cria encontrados en residencias y talleres durante los anos 2016 y 2017	23
Figura 2	Proporcion de OTUs en cada muestra analizada de *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus*	25
Figura 3	Curva de acumulacion de OTUs encontrados en el analisis de 1000 secuencias por muestra	26
Figura 4	Los 20 OTUs mas frecuentes en *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus*	28
Figura 5	Presencia de *Wolbachia*	31
Figura 6	Los 20 OTUs mas frecuentes en los talleres y residencias muestreados	31
Figura 7	Diversidad microbiana a nivel de genero en diferentes materiales como sitios de cria	32
Figura 8	Los 20 OTUs mas abundantes en larvas de *Aedes aegypti* en comparacion con sus frecuencias en adultos	32
Figura 9	Los 20 OTUs mas abundantes en larvas de *Aedes aegypti* en comparacion con sus frecuencias en adultos	33
Figura 10	Total de talleres de compra y venta de llantas usadas georreferenciados durante los anos 2015 y 2016	43
Figura 11	Talleres positivos para huevos de *Aedes*	49
Figura 12	Presencia de *Aedes aegypti* y/o *Aedes albopictus* en ovitrampas y sitios de cria en talleres	50

ANEXO FIGURAS

Figura S1	Ejemplo de sitios de cria donde pueden encontrarse *Aedes aegypti* y/o *Aedes albopictus*	78
Figura S2	Muestra de residencias visitadas durante los anos 2016 y 2017	79
Figura S3	Muestra de talleres visitados durante los anos 2016 y 2017	80
Figura S4	Metodologia de recolecta y manejo de muestras	81
Figura S5	Caracteres para la identificacion taxonomica de larvas y adultos de *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus*	82
Figura S6	Histograma de distribucion de las medidas de temperatura y pH	83
Figura S7	Grafica de correlacion entre temperatura y pH	84
Figura S8	Distribucion de las OTUs encontradas en distintas categorias	85
Figura S9	Diversidad de Phylla microbianos encontrados en *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus*	86
Figura S10	Postura de huevos del genero *Aedes* encontrada en ovitrampas	87

INDICE DE CUADROS

Cuadro 1	Especimenes utilizados en el análisis de comunidad microbiana por especie, estadio y lugar	18
Cuadro 2	Resultados de la seleccion de modelo por AICc para cada especie	25
Cuadro 3	Indices de diversidad y equidad de la comunidad bacteriana	29
Cuadro 4	Relaciones significantes entre la abundancia de OTUs con respecto a la temperatura	34

ANEXO II CUADROS

Cuadro S1	Rangos de tolerancia y temperatura optima (°C) de desarrollo de distintas especies de mosquitos de acuerdo a la literatura	89
Cuadro S2	Literatura sobre el estudio del efecto del pH en distintas especies de Culicidae	90
Cuadro S3	Sitios de cria hallados en residencias en localidades de Panama durante 2016 y 2017	91
Cuadro S4	Sitios de cria hallados en talleres de llantas usadas en las carreteras de Panama durante 2016 y 2017	94
Cuadro S5	Talleres de compra y venta de llantas usadas muestreados mediante ovitrampas y/o busqueda activa durante 2016 y 2017	96

RESUMEN

Las especies de mosquitos *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus* son importantes vectores de virus Aunque su historia en la Republica de Panama ha sido muy distinta ambas especies se encuentra hoy en dia presentes y ampliamente distribuidas en el territorio nacional Ambas especies tienen preferencias de habitat larvario muy similares y pueden llegar a coocurrir en los mismos sitios de cria habitualmente llantas usadas tanques plasticos de agua y otros recipientes de origen antropico capaces de acumular agua

Para entender la relacion de estas especies en su estado larval con los habitats que ocupan asi como para conocer sobre posibles patrones de competencia en 2016 y 2017 se llevo a cabo un extenso muestreo a lo largo y ancho del pais en el que se recolectaron estadios inmaduros de sitios de cria en residencias familiares y talleres de llantas usadas tomando medidas de Temperatura y pH del agua para relacionar la presencia o ausencia de estas especies a las variables fisico quimicas Asi mismo se estudio la composicion de la comunidad microbiana presente en estas especies con el objetivo de encontrar patrones que expliquen la distribucion de *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus*

Aedes aegypti no se vio afectada por la variacion de temperatura y pH estudiados *Aedes albopictus* sin embargo parece mostrar una mayor afinidad por temperaturas menores que *Aedes aegypti* lo que tiene sentido dado su origen en latitudes templadas del planeta La diversidad microbiana fue mayor en *Aedes aegypti* que en *Aedes albopictus* Wolbachia fue encontrada en ambas especies y en distintas regiones del pais distantes entre si lo que hace de este trabajo el primer reporte de *Wolbachia* en poblaciones salvajes de *Aedes aegypti*
Por otro lado con el objetivo de estudiar el papel que juegan los talleres de llantas usadas en la distribucion y dispersion de *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus* se muestrearon mediante ovitrampas y busqueda activa un total de 101 talleres a lo largo de las principales vias de circulacion del pais Alrededor del 81% de los talleres muestreados fueron positivos para huevos de *Aedes* un porcentaje elevado y representativo de la situacion actual De los 69 talleres donde se consiguio informacion a nivel de especie *Aedes aegypti* aparecio en 44 y *Aedes albopictus* en 48 Un analisis de co ocurrencia indica que las especies se encuentran en exclusion competitiva La distribucion espacial de las especies es heterogenea lo que parece indicar que la predominancia de una especie en un territorio con respecto a la otra esta condicionada por otros factores mas alla de su efectividad para criarse y viajar en llantas

SUMMARY

The mosquitoes *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* are important vectors of viruses Despite they have a different life history in the Republic of Panama both species are nowadays present and widely distributed across the territory Both species share larval habitat preferences and they could co occur in the same artificial breeding sites as used tyres water plastic tanks and other man made recipients

To understand the relationship between these species at the larval habitats they exploit and in order to know potential competence patterns an extent sampling campaign was carried out in 2016 and 2017 where we collect immature stages of mosquitos in breading sites in familiar houses and used tyres seller garages measuring temperature and pH of the water to link the presence or absence of these species to the physical chemical variables In addition we studied the microbial community present in *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* to search for patterns explaining the species distribution

Aedes aegypti was not affected by the variability of the studied temperature and pH intervals However *Aedes albopictus* seems to show an affinity fo lower temperatures than *Aedes aegypti* Microbial diversity was higher in *Aedes aegypti* than *Aedes albopictus* *Wolbachia* was find in both species and in different and distant regions in the country and it is probably the first time where *Wolbachia* is found in wild populations of *Aedes aegypti*

On the other hand with the aim to study the role of used tyres garages in the distribution and dispersal of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* we sampled by ovitraps and active surveillance a total of 101 garages across the main roads of the country Around the 81% of the sampled garages was positive for *Aedes* eggs a high percentage and representative of the current situation in the whole country From the 69 garages where we collect species level information *Aedes aegypti* was found in 44 and *Aedes albopictus* in 48 A co ocurrence analysis shows that the species are in a process of competitive exclusion The heterogeneous spatial distribution of the species indicates that the predominance of one specie on the other is probably conditioned by others factors besides their effectivity to bread and travel in used tyres

INTRODUCCION

Las especies de mosquitos *Aedes aegypti* L. 1762 y *Aedes albopictus* Skuse 1895 son importantes vectores de virus que causan enfermedad en el ser humano. Pese a su diferente origen geografico, ambas especies son muy similares desde el punto de vista ecologico y de salud publica, ya que son capaces de transmitir numerosos Arbovirus o *virus transmitidos por artropodos*, algunos de ellos de gran relevancia epidemiologica (Kraemer *et al.* 2015).

Aedes aegypti es una especie de origen africano conocida comunmente como el mosquito de la fiebre amarilla, aunque esta enfermedad esta actualmente menos extendida gracias a la vacunacion, y se le asocia mas con la transmision de dengue, chikungunya y zika (Barrett & Higgs 2007). Powell & Tabachnick (2013), en su revision sobre la domesticacion y dispersion de *Aedes aegypti* en las Americas, describen que este mosquito fue introducido en el continente americano desde Africa por medio de navios durante los primeros años de la colonizacion y posiblemente llevo consigo el virus de la fiebre amarilla. Este virus, que hasta el momento era desconocido en America, causo su primera epidemia en Yucatan Mexico, en 1648, aunque pudo estar presente en la isla de la española incluso desde 1495. De acuerdo a Tabachnick (1991), *Aedes aegypti* fue introducido en Asia a finales del siglo XIX. Aunque el origen de esta introduccion no esta claro, se cree que llego desde America o desde el norte de Africa tras la apertura del Canal de Suez. Actualmente, *Aedes aegypti* se encuentra distribuido ampliamente por los tropicos y subtropicos del mundo (Kraemer 2015).

Aedes albopictus, el mosquito tigre, es originario de Asia oriental y al igual que *Aedes aegypti* se encuentra mundialmente distribuido en los tropicos, asi como tambien como en las regiones templadas (Kraemer 2015). La historia de invasion en America de *Aedes albopictus* es diferente a la de *Aedes aegypti*, ya que se considera que colonizo

el continente hace alrededor de 30 años debido principalmente al comercio internacional de llantas usadas (Yee 2016) Epidemiologicamente hablando *Aedes albopictus* tambien es relevante ya que es capaz de transmitir mas de 20 arbovirus entre los que se encuentran dengue chikungunya y Nilo occidental (Moore & Mitchel 1997) Pese a que no parece envuelto en la transmision zika de forma natural estudios de laboratorio han confirmado su elevada capacidad para transmitir este virus (Chaoum Carneiro *et al* 2016)

Las formas inmaduras de *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus* son muy similares desde el punto de vista ecologico debido a que ambas especies se crian habitualmente en contenedores artificiales tales como tanques plasticos recipientes de ceramica y llantas que acumulan agua producto de actividades humanas (Preechaporn *et al* 2006) Practicamente cualquier objeto capaz de almacenar agua es susceptible a la infestacion por estas especies de mosquitos *Aedes albopictus* tambien es capaz de explotar habitats naturales tales como los huecos de arboles en el bosque y las plantas de jardin en areas residenciales (Tsuda & Takagi 1994) La capacidad de criarse en contenedores de agua artificiales y naturales permite que estas especies puedan co ocurrir en un mismo recipiente dando lugar a procesos ecologicos como la competencia por espacio recurso y pareja (Briks *et al* 2004)

Los adultos de *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus* difieren ligeramente en sus habitos alimenticios Mientras que las hembras de *Aedes albopictus* son generalistas y se alimentan de diversas especies de mamifero incluidos los seres humanos (Delatte *et al* 2010) las hembras de *Aedes aegypti* son especialmente antropofilicas (Ponlawat & Harrington 2005) lo que la convierte en el vector principal de los virus antes citados ya que pica al ser humano con mayor frecuencia que *Aedes albopictus* No obstante ambas especies parecen capaces de alimentarse de varios hospederos durante un mismo ciclo

gonotrofico (Scott *et al* 1993 Delatte *et al* 2010) lo que aumenta las posibilidades de transmision de virus

La caracteristica mas notable que ha permitido a estas especies alcanzar regiones tan distantes desde su lugar de origen es la resistencia de sus huevos a la desecacion (Juliano & Lounibos 2005) De acuerdo al trabajo de Sota & Mogi (1992) los huevos de *Aedes aegypti* pueden permanecer viables por mas de cuatro meses en condiciones de humedad y temperatura adecuadas mientras que los de *Aedes albopictus* sobreviven hasta 2 5 meses siendo mas susceptibles que los de *Aedes aegypti* a condiciones de baja humedad y alta temperatura

Las larvas de *Aedes albopictus* parecen ser mas eficaces que las de *Aedes aegypti* en la explotacion de los recursos en los sitios de cria (Juliano 1998) Esta ventaja se considera una de las razones por las que *Aedes albopictus* esta desplazando a *Aedes aegypti* en algunas regiones del planeta dando lugar a la practica desaparicion de esta ultima de sitios donde se distribuia historicamente (O meara *et al* 1995) No obstante la mortalidad de huevos de *Aedes albopictus* en ambientes secos puede invertir esta ventaja en favor de *Aedes aegypti* por lo que la competencia entre las dos especies se considera dependiente de las condiciones ambientales (Costanzo *et al* 2005)

El primer capitulo de la tesis tiene como objetivo investigar la dinamica del habitat larval de *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus* en ambientes antropicos de Panama En esta seccion especificamente intento identificar la influencia de las variables fisico quimicas del agua (pH y Temperatura) sobre la existencia o co existencia de estas especies y su relacion con la comunidad microbiana en los sitios de cria La hipotesis a probar es que debido al origen distinto de las especies el rango de tolerancia de las variables fisico quimicas asi como la composicion de la comunidad bacteriana sera diferente en cada especie Por otro lado el segundo capitulo tiene como objetivo identificar la infestacion

de *Aedes* y el porcentaje de co ocurrencia de *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus* en talleres para la compra y venta de llantas usadas distribuidos en las principales carreteras del país La hipótesis a probar es que ambas especies ocurren indistintamente en talleres a lo largo de la carretera El desarrollo de esta tesis aportará información valiosa para validad los resultados de Miller & Loaiza (2015) quienes proponen que la red de carreteras de Panamá explica la expansión agresiva de *Aedes albopictus* en el país

CAPITULO I

Influencia de la fisico-quimica del habitat y la composicion bacteriana en la presencia de *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus* en ambientes antropicos de Panama

1 1 Marco teorico

1 1 1 Determinantes ambientales del habitat larval

Aedes aegypti y *Aedes albopictus* deben parte de su exito ecologico a su capacidad para criarse en contenedores artificiales producto de actividades humanas pues es lo que les ha permitido colonizar gran parte del planeta (Kraemer *et al* 2015) Estos recipientes pueden ser muy variables en cuanto a forma tamaño y material siendo habituales los tanques de plastico las llantas usadas y los objetos de ceramica o de metal (Chan & Chan 1971 Getachew *et al* 2015) La densidad larval y el desarrollo de ambas especies en estos ambientes depende de la interaccion entre factores abioticos como la temperatura el pH o la disponibilidad de nutrientes y factores bioticos como la simbiosis bacterianas la depredacion o la competencia (Tun Lin *et al* 2000)

1 1 1 1 Temperatura

Los mosquitos como el resto de los insectos son animales heterotermos que dependen de la temperatura como uno de los factores mas importantes para su desarrollo y supervivencia (Ewing *et al* 2016) Temperaturas muy altas o muy bajas pueden hacer inviable la vida de los mosquitos por lo que las distintas especies ven limitada su distribucion en el rango de temperaturas que son capaces de tolerar

Numerosos estudios han tratado de estimar los rangos de tolerancia de distintas especies de mosquitos en especial de las mas importantes en terminos de salud publica (Cuadro S1) La mayor parte de estos estudios se basa en la cria de especimenes en

laboratorio a distintos intervalos de temperatura para comprobar el efecto de esta en los rasgos de la historia natural por ejemplo la duracion del desarrollo larval y la supervivencia hasta el estado adulto el peso y el tamaño la longevidad y/o fecundidad En general estos trabajos coinciden en que los mosquitos presentan una tasa optima de desarrollo entre los 20 C y los 30 35°C por debajo y por encima de este intervalo el desarrollo se ralentiza drasticamente y en los umbrales limite el desarrollo no culmina

La mayoria de estos estudios se realizaron con temperaturas constantes sin tener en cuenta la fluctuacion dial o estacional la cual afecta negativamente al desarrollo de los mosquitos (Headlee 1942) Estos estudios pueden sub o sobre estimar los valores de algunos caracteres importante en comparacion con las condiciones naturales donde la temperatura es variable (Carrington *et al* 2013) La velocidad de desarrollo maxima no siempre coincide con una tasa mayor de supervivencia hasta el estado adulto Bayoh & Lindsay (2003) describieron que pese a obtener ciclos mas cortos a temperaturas entre 30 y 32 C la supervivencia fue mayor a temperaturas menores En conclusion los estudios mas recientes situan el rango de tolerancia de *Aedes aegypti* entre 8 5°C (Tsuda & Takagi 2001) y 39 C (Marinho *et al* 2016) mientras que *Aedes albopictus* podria criarse a temperaturas de entre 5 3 C (Tsuda & Takagi 2001) y 40°C (Delatte *et al* 2009)

1 1 1 2 pH

El pH es otro de los factores que habitualmente influye en la vida de los organismos acuaticos Tanto valores de pH acidos como alcalinos pueden resultar toxicos para muchas formas de vida (Bell 1971) Por ejemplo en aguas alcalinas se incrementa la toxicidad de sustancias como el amonio mientras que en aguas hipoxicas se acumulan

sustancias acidas como el sulfuro un fuerte veneno metabolico que interfiere en la res piracion oxidativa (Walker 2016)

Son numerosos los trabajos que se han llevado a cabo con el objetivo de comprender el efecto del pH del agua en el desarrollo y la supervivencia de los estados inmaduros de los mosquitos (Cuadro S2) Tras casi un siglo de estudios se ha llegado a la conclu sion de que el pH no tiene un efecto importante en el desarrollo de las larvas e incluso algunos autores consideran a los mosquitos como uno de los grupos de animales mas insensibles al pH ambiental y tremendamente efectivos en la regulacion del pH interno (Clark *et al* 2004)

No obstante pese a que el pH no ejerza un efecto directo en el desarrollo o supervi vencia de los estados inmaduros de los mosquitos se considera importante como indi cador de otros factores quimicos y biologicos de los que depende el desarrollo de las larvas (MacGregor 1929) Por ejemplo el pH del agua esta intimamente relacionado con la diversidad y abundancia de bacterias (Lindstrom 2000) consideradas como la principal fuente de alimento de las larvas (Merritt *et al* 1992) Asi los posibles efectos observados en el desarrollo de los mosquitos en condiciones de acidez o alcalinidad no se deben a un efecto directo del pH sobre las larvas sino probablemente a un empobre cimiento o enriquecimiento de la fuente de alimento (Harold 1926)

1 1 1 3 Comunidad bacteriana

La relacion entre animales y bacterias es considerada un factor importante en la evo lucion y especiacion de ambas partes siendo en muchos casos de caracter intimamente simbiotico (Ley *et al* 2008) Por ejemplo la microbiota presente en el tracto digestivo

del ser humano es esencial para la adquisicion de nutrientes (Human Microbiome Project Consortium 2012) Es tan estrecha esta relacion que se propuso el termino holobionte como unidad biologica que comprende tanto al organismo hospedero como tambien a todos los microorganismos asociados a el (Richardson 2017) En los insectos las bacterias estan involucradas en importantes funciones como la nutricion la produccion el desarrollo y la defensa contra enemigos Por ejemplo surten de aminoacidos esenciales o vitaminas a sus hospederos (Douglas 1998) o confieren resistencia contra algunos parasitos (Guay *et al* 2009)

Bacterias de los generos *Serratia* y *Enterobacter* contienen enzimas hemoliticas que facilitan la digestion de la sangre en dipteros hematofagos (De o Gaio *et al* 2011) Otras bacterias son capaces de producir compuestos insecticidas como *Bacillus thuringiensis* cuya toxina *cyt* degrada la membrana del tracto medio de las larvas causandoles la muerte (Gonzalez *et al* 1982)

Tambien hay bacterias que colonizan los organos reproductores y manipulan la reproduccion de sus insectos hospederos para dispersarse mas eficientemente en sus poblaciones La mas conocida es la bacteria *Wolbachia* un endosimbionte intracelular y heredable por via materna que se encuentra en distintos grupos de artropodos (Werren *et al* 2008) *Wolbachia* induce incompatibilidad citoplasmatica en los insectos entre otros efectos Esto evita que machos infectados tengan progenie viable con hembras no infectadas o infectadas con otra cepa de *Wolbachia* (Guruprasad *et al* 2014)

Wolbachia esta siendo estudiada como controlador potencial de mosquitos vectores con enfasis en el genero *Aedes* y puede encontrarse en poblaciones salvajes de *Aedes albopictus* (Ormetxe *et al* 2011) Generalmente se considera que la especie *Aedes aegypti* no esta infectada con *Wolbachia* de forma natural y la literatura mas actual asi lo refleja (Pan *et al* 2017) No obstante en 2016 Coon y colaboradores encontraron

especimenes salvajes de *Aedes aegypti* infectados con *Wolbachia* en Florida ELUU siendo este el unico reporte hasta la fecha De una manera u otra tanto *Aedes aegypti* como *Aedes albopictus* pueden ser infectadas en laboratorio con la cepa de *w*Mel de *Drosophila melanogaster* la cual ha probado ser muy efectiva en la induccion de incompatibilidad citoplasmatica y dispersandose entre los individuos de las colonias de laboratorio (Xi *et al* 2005 McMeniman *et al* 2009 Blagrove *et al* 2013 Hoffmann *et al* 2014)

A la capacidad de *Wolbachia* de multiplicarse y mantenerse por si sola en la poblacion de mosquitos hay que añadir la capacidad que tiene esta bacteria simbionte de modificar la competencia vectorial haciendo a los mosquitos menos efectivos en la transmision de patogenos Por ejemplo es capaz de bloquear la transmision de Dengue Chikungunya Zika y *Plasmodium* en *Aedes aegypti* (Moreira *et al* 2009 Walker *et al* 2011 Dutra *et al* 2016) asi como tambien Dengue y Chikungunya en *Aedes albopictus* (Blagrove *et al* 2012 2013) Se han realizado algunos experimentos de campo para probar la capacidad de *Wolbachia* de controlar la poblacion de *Aedes aegypti* Hoffmann y colaboradores (2011) liberaron individuos de *Aedes aegypti* infectados con la cepa *w*Mel en dos localidades de Australia logrando una dispersion significativa de la bacteria en la poblacion de mosquitos

Por otro lado contrario al efecto de *Wolbachia* algunas bacterias potencian las capacidades del vector para transmitir el patogeno como en el caso de la mosca tsetse *Glossina* cuyo simbionte *Sodalis glossidinius* mejora la capacidad vectorial de la tripanosomiasis africana (Farikou *et al* 2010)

Generalmente las bacterias han sido consideradas los microorganismos mas importantes en la dieta de las larvas de mosquito (Merritt *et al* 1992) y es mediante la ali

mentacion larvaria que los mosquitos adquieren del medio la mayor parte de las bacte rias que compondran su microbiota (Duguma *et al* 2013) La comunidad bacteriana en el mosquito sera una muestra de la biodiversidad en el sitio de cria la cual puede variar debido a la situacion geografica las condiciones fisico quimicas del medio o el tipo de recipiente

1 2 Objetivos

1 2 1 Comparar las variables físico químicas del agua en criaderos de *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus*

1 2 2 Comparar la comunidad bacteriana en criaderos de *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus*

1 3 Materiales y metodos

1 3 1 Recolecta activa de estadios inmaduros y toma de datos

Las recolectas de mosquitos se llevaron a cabo entre 2015 y 2017 en localidades urbanas y rurales de todas las provincias y en algunas comarcas indigenas del pais Tambien se recolectaron mosquitos en talleres para la compra y venta de llantas usadas a lo largo de las carreteras primarias de Panama (Cuadros S3 y S4)

El procedimiento consistio en la busqueda activa de recipientes con agua susceptible a la infestacion con estados inmaduros de *Aedes aegypti* y/o *Aedes albopictus* (Fig S1) Esta busqueda se llevo a cabo en jardines y patios de viviendas de las distintas localidades (Fig S2) asi como tambien en los talleres visitados previo consentimiento de los inquilinos y/o propietarios (Fig S3) Para cada recipiente positivo encontrado se tomaron las coordenadas geograficas del punto se midio el pH y la temperatura del agua y se categorizo el tipo de recipiente Los especimenes (larvas y pupas) eran recolectados en bolsas Whirl Pak (Whirl Pak® Nasco USA) y transportados al laboratorio con agua de sus respectivos criaderos (Fig S4)

1 3 2 Cria y manejo de especimenes en laboratorio

Las muestras fueron colocadas en camaras de emergencia consistentes en vasos plasticos transparentes con una malla de tul cubriendo la apertura (Fig S4) En estas camaras los especimenes se desarrollaron a temperatura ambiente Parte de los individuos

fueron sacrificados en el tercer o cuarto estado larval mientras que el resto fue criado hasta el estado adulto Esto fue planificado de esta forma para poder comparar la comunidad bacteriana entre las larvas y adultos de *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus*

Los mosquitos se identificaron mediante claves taxonomicas en base a caracteres morfologicos de la larva de cuarto estado y del adulto (Rossi & Almiron 2004 Rueda 2004) Los principales caracteres utilizados para la identificacion de las larvas fueron la forma de los dientes del peine caudal (Con forma de tridente en *Aedes aegypti* y con una sola pua larga en *Aedes albopictus*) las espinas toracicas (Mas grandes y conspicuas en *Aedes aegypti* que en *Aedes albopictus*) y la seta cefalica numero VII (Simple en *Aedes aegypti* y doble en *Aedes albopictus*) (Fig S5) Los caracteres utilizados para la identificacion de adultos fueron principalmente el patron de escamas blancas del *notum* con forma de lira en *Aedes aegypti* y con una sola linea central en *Aedes albopictus* y las escamas blancas del *rostrum* presentes en *Aedes aegypti* pero ausentes en *Aedes albopictus* (Fig S5) Una vez identificados los individuos fueron preservados en seco individualmente en microviales a 20°C hasta el momento del analisis de la comunidad bacteriana

1 3 3 Extraccion de ADN y creacion de librerias del gen 16S

La extraccion de ADN de los mosquitos (Larva o adulto) se realizo individualmente mediante el protocolo del Biosprint® 96 DNA blood kit y posteriormente se amplifico la region V4 del ARNr 16S en reacciones de 12 5 µl usando los cebadores o primers F515 (5 GTGCCAGCMGCCGCGGTAA 3) y R806 (5 GGACTACHVGGGTWTCTAAT 3) La concentracion de reactivos y las condiciones utilizadas en la reaccion de PCR fueron las descritas en Caporaso *et al* (2011) El ADN

obtenido se agrupo en *pools* de 6 individuos siempre de la misma especie sitio de cria y estado de desarrollo De estos *pools* se realizaron tres PCR individuales y se visualizaron 2 µl de cada una en un gel de agarosa al 1 5% para confirmar la presencia de bandas de 250 n_B antes de agrupar en *pools* 10 µl de cada triplicado de los productos de PCR Cada *pool* fue purificado con Serapure Beads (Thermo Fisher Scientific Waltham MA USA) y usado como plantilla para una segunda PCR en la que se añadio las secuencias de adaptadores (Standard Illumina adaptors) Los productos de la segunda PCR fueron purificados con Serapure Beads y la concentracion de ADN igualada con 20 µl platos de normalizacion de Charm Biotech (Charm Biotech San Diego CA USA) para crear las librerias

En total 940 especimenes (470 de cada especie) fueron procesados para la extraccion de ADN y creacion de librerias La porcion de larvas y adultos y la procedencia de estos ultimos (Localidades o talleres) se recoge en la Cuadro 1

Las muestras de cada especie se prepararon en 75 pools de 6 individuos siempre de la misma especie sitio de recolecta y estadio y 20 individuos analizados individualmente dando un total de 190 muestras

Cuadro 1 Especimenes utilizados en el analisis de comunidad microbiana por especie estadio y lugar

	Aedes aegypti		*Aedes albopictus*	
	Larva	Adulto	Larva	Adulto
Localidades	106	270	108	268
Talleres	0	94	0	94

1 3 4 Analisis de la comunidad bacteriana

El software QIIME v1 9 (Caporaso *et al* 2010) y scripts de Python fueron utilizados para realizar los analisis con las secuencias de bacterias obtenidas con del gen ARNr 16S Las Unidades Taxonomicas Operativas (OTUs) fueron seleccionadas con el protocolo de referencia abierta (pick_open_reference_otus py) el cual identifica las secuencias comparandolas con una base de datos preexistente Ademas se estimo el numero de OTUs para cada especie de mosquito tipo de criadero y en relacion con los valores de pH y temperatura del agua Para evitar posibles errores en la asignacion de OTUs debidos a errores aleatorios de secuenciacion se eliminaron de los analisis todos aquellas secuencias cuya frecuencia de aparicion era menor de 0 005% (Bokulich *et al* 2013)

Para estimar el grado de disimilitud (distancia) entre dos comunidades bacterianas utilizamos la metrica UniFrac La distancia Unifrac se basa en la fraccion de la longitud de la rama compartida entre dos comunidades dentro de un arbol filogenetico construido mediante secuencias geneticas de ARNr 16S de todas las comunidades comparadas Una distancia UniFrac relativamente pequena implica que las dos comunidades son similares en su composicion con linajes y que comparten una historia evolutiva comun En la distancia UniFrac no ponderada (unweighted Unifrac) solo se considera la presencia o ausencia de los linajes En la distancia UniFrac ponderada (weighted Unifrac) la longitud de las ramas esta ponderada basandose en las abundancias relativas de los linajes dentro de las comunidades Se estimo la curva de acumulacion de OTUs el indice de diversidad de Shannon Wiener que tiene en cuenta la riqueza de OTUs y la proporcion de los mismos y el indice de equidad de Pielou que considera la proporcion

de la diversidad observada con relacion a la maxima diversidad esperada Se realizaron test de comparacion de medianas con la prueba de U Mann Whitney Wilcoxon en el software estadistico R (R Core Team 2017) para estimar diferencias en la diversidad entre especies lugar de recolecta (residencias vs talleres) y estadio (larvas vs adultos) Se utilizo el analisis de similitud ANOSIM mediante el script *compare_categories py* in QIIME para confirmar diferencias en la composicion de la comunidad bacteriana entre tipos de criadero ANOSIM es un test estadistico no parametrico que compara distancias clasificadas de diversidad beta entre diferentes grupos y calcula un valor de p y un coeficiente de correlacion por permutacion Para estimar posibles cambios en la comunidad microbiana en relacion con la variacion de temperatura y pH se realizaron sendos analisis de correlacion de Pearson mediante el script de Python *observation_metadata_correlation py* in QIIME

1 3 5 Analisis de la temperatura y el pH

La normalidad de las variables Temperatura y pH se analizo mediante un test de Shapiro Wilk en el software Past3 (Hammer *et al* 2001) Pese a que el pH esta inversamente relacionado con la temperatura (es decir que a mayor temperatura el pH es mas acido y viceversa) esta relacion es observada unicamente para agua pura y la oscilacion de pH es muy lenta en comparacion a la variacion de la temperatura (pH 7 a 25 C vs pH 6 5 a 60 C) (Dotro *et al* 1994) por lo que las impurezas del agua detritos etc facilmente enmascaran esta relacion Para confirmar esto se realizo una prueba estadistica de correlacion de Pearson entre estas dos variables en los criaderos positivos

Posteriormente se realizo un analisis de regresion logistica para contrastar la presencia y ausencia de *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus* con los valores de temperatura

y pH del agua en los criaderos. Se realizaron modelos lineales generalizados que incluían: 1) La interacción entre temperatura y pH, 2) Temperatura y pH, 3) Temperatura sola, 4) pH solo, 5) un modelo nulo (No existe influencia del pH y/o la temperatura sobre la presencia de *Aedes*). Estos cinco modelos se corrieron para cada especie. Tanto la prueba de correlación como la de regresión logística se realizaron mediante R utilizando el paquete AICcmodavg (Mazerolle, 2017) para evaluar los modelos mediante el AIC (Akaike's Information Criterion).

1 4 Resultados

En total se encontraron 154 criaderos positivos para mosquitos del genero *Aedes* de los cuales 90 estuvieron ubicados en residencias y 64 en talleres para la compra y venta de llantas usadas En las residencias el 53% de los criaderos contenian *Aedes aegypti* mientras que el 54% estaban infestados con *Aedes albopictus* (Fig 1 Cuadro S3) Por otro lado en los talleres *Aedes aegypti* estuvo presente en el 47% de los criaderos encontrados y *Aedes albopictus* en el 72% (Cuadro S4) En total *Aedes aegypti* se encontro en el 51% de los criaderos mientras que *Aedes albopictus* en el 62% de los casos

1 4 1 Analisis de Temperatura y pH

Tanto la temperatura como el pH siguen una distribucion normal (Temperatura W = 0 99 y p valor = 0 35 pH W = 0 98 y p valor = 0 18) (Fig S6) La temperatura vario entre 23 60°C y 34 84°C con una media de 27 9°C mientras que el pH oscilo entre 5 51 y 12 4 con una media de 8 57

1 4 2 Analisis de correlacion y modelos de regresion logistica

No se encontro una correlacion de tipo lineal o monotonica estadisticamente significativa entre el pH y la temperatura (r = 0 2868) (Fig S7)

De acuerdo a los valores de AICc el mejor modelo para *Aedes aegypti* es el nulo aunque el modelo con temperatura como variable explicativa es tambien equivalente de

acuerdo al Delta-AICc (Cuadro 2). No obstante, el valor de p asociado a la temperatura en ese modelo no fue significativo estadísticamente (Z = 1.034, p-valor = 0.30). Estos resultados sugieren que la presencia de *Aedes aegypti* no se ve afectada dentro del rango de temperatura y pH analizado.

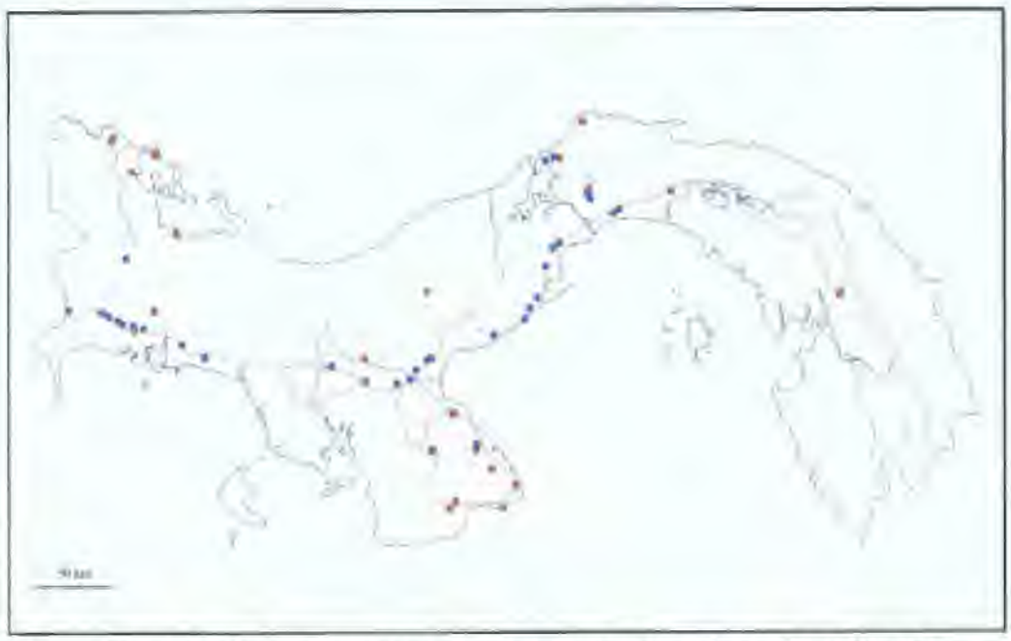


Figura 1. Mapa de los sitios de cría encontrados en residencias y talleres durante los años 2016 y 2017. En Rojo: búsqueda activa en residencias. Azul: búsqueda activa en talleres

Cuadro 2. Resultados de la selección de modelo por AICc para cada especie

	Modelos	K	AICc	Delta_AICc	ModelLik	AICcWt	LL	Cum.Wt
				Aedes aegypti				
5	Nulo	1	231.281	0.000	1.000	0.399	-114.628	0.399
3	T°	2	232.241	0.960	0.619	0.247	-114.084	0.645
4	pH	2	232.845	1.564	0.457	0.182	-114.386	0.827
2	T° + pH	3	234.157	2.876	0.237	0.095	-114.004	0.922
1	T° * pH	4	234.545	3.264	0.196	0.078	-113.148	1.000
				Aedes albopictus				
	Modelos	K	AICc	Delta_AICc	ModelLik	AICcWt	LL	Cum.Wt
3	T°	2	223.839	0.000	1.000	0.538	-109.882	0.538
2	T° + pH	3	225.094	1.256	0.534	0.287	-109.473	0.825
1	T° * pH	4	227.105	3.267	0.195	0.105	-109.429	0.930
5	Nulo	1	228.932	5.093	0.078	0.042	-112.429	0.972
4	pH	2	229.734	5.895	0.052	0.028	-113.855	1.000

Para *Aedes albopictus* el modelo que contiene temperatura como variable explicativa es el mejor en terminos de AICc El modelo con Temperatura y pH es equivalente de acuerdo al Delta AICc (Cuadro 2) El valor de p asociado a la temperatura en el modelo que contiene unicamente temperatura es negativamente significativo (Z = 2 680 p valor = 0 00736) lo que indica que *Aedes albopictus* parece preferir temperaturas mas bajas dentro del rango estudiado El pH por el contrario no parece afectar de manera significativa la presencia de *Aedes albopictus*

1 4 3 Analisis de la comunidad bacteriana

De las 190 muestras procesadas (150 pools de 6 mosquitos c/u y 40 especimenes individuales) 11 (3 individuos de *Aedes aegypti* y 8 pools de *Aedes albopictus*) fallaron en el proceso de extraccion y amplificacion de secuencias por lo que al final se obtuvieron secuencias en 179 muestras de las cuales 142 fueron pools (75 de *Aedes aegypti* 67 de *Aedes albopictus*) y 37 mosquitos analizados individualmente (17 *Aedes aegypti* 20 *Aedes albopictus*) (Fig 2)

La curva de acumulacion de especies (Fig 3 OTUs observados) muestra la gran variabilidad en la diversidad encontrada en las secuencias de cada muestra Se encontraron un total de 234 OTUs los cuales fueron asignados a 18 phyla 104 familias y 156 generos Sobre el 67% de las secuencias leidas fue asignada hasta nivel de genero y el 33% restante pudo unicamente asignarse a niveles superiores (Phylum Clase Orden o Familia) lo que sugiere la existencia de taxas no caracterizados aun El Phylum *Proteobacteria* supone el 89 2% de toda la diversidad encontrada y junto a los phyla *Bacteroidetes* *Actinobacteria* *Firmicutes* *Planctomycetes* suponen el 98% del total (Fig S9)

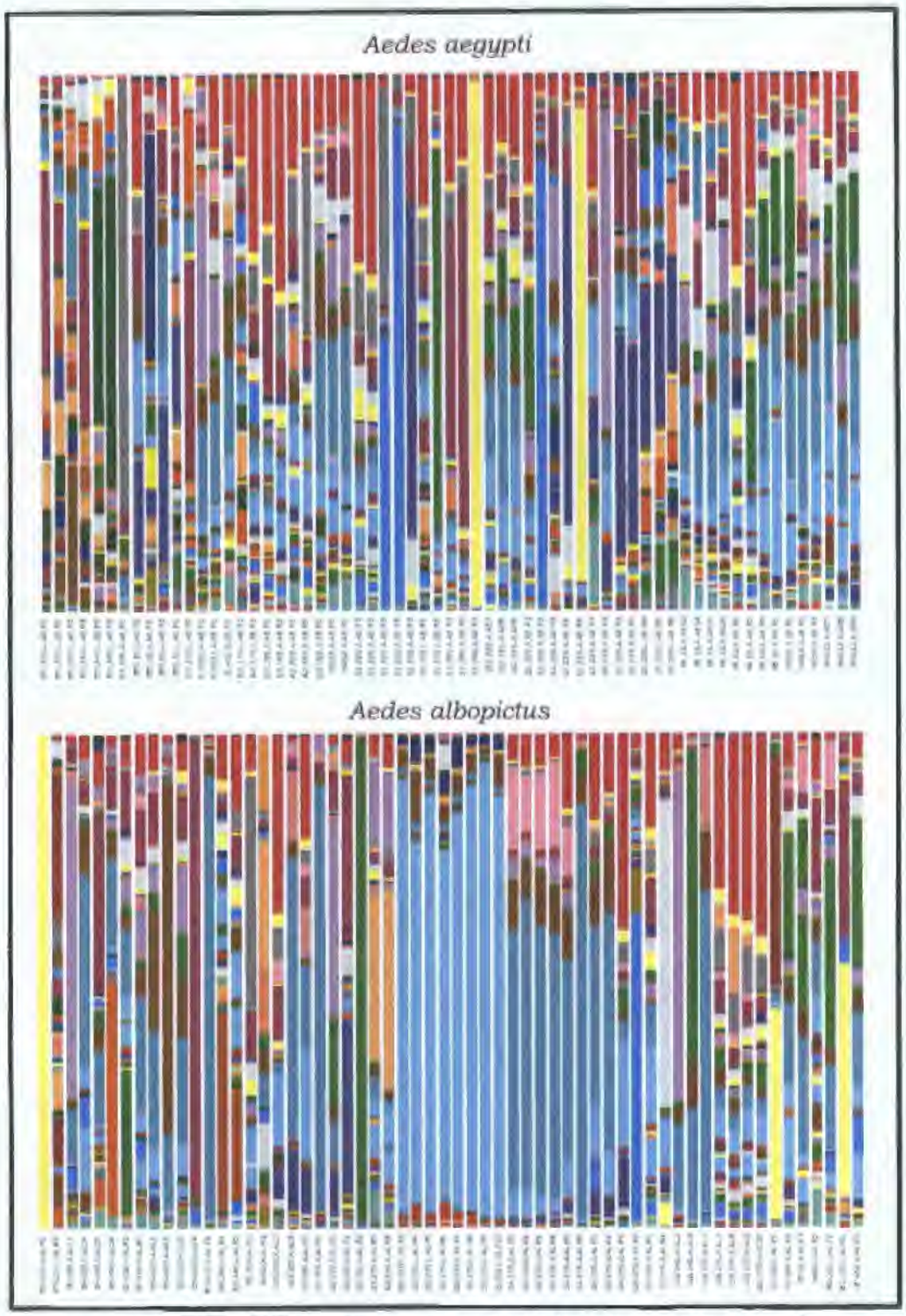


Figura 2. Proporción de OTUs en cada muestra analizada de *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus*

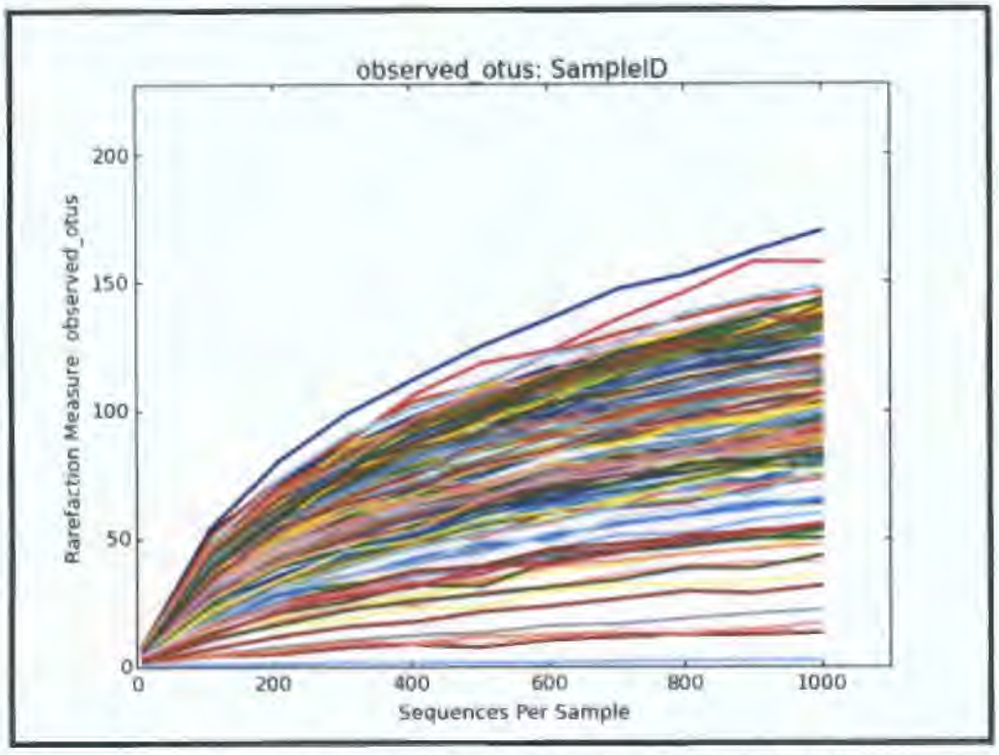


Figura. 3 Curva de acumulación de OTUs encontrados en el análisis de 1000 secuencias por muestra.

1.4.3.1 *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus*

Aedes aegypti y *Aedes albopictus* compartieron casi el 92% de los OTUs encontrados (Fig. S8). No obstante, la diversidad entre las especies fue significativamente distinta (W = 3634, p-valor = 0.0002), siendo la comunidad microbiana de *Aedes aegypti* más diversa (H' = 3.40) y con mayor equidad (J' = 0.62) que *Aedes albopictus* (H' = 2.56, J' = 0.47) (Cuadro 3, Fig. 4). La bacteria gram-negativa *Xanthobacter* representa en torno al 36% del total de la diversidad de *Aedes albopictus*, siendo el taxa más abun-

dante y junto a *Novispirillum* y un genero indefinido de Comamonadaceae (que llamaremos Comamonadaceae1 para facilitar su referencia) suponen casi el 63% de la diversidad

Por el contrario en *Aedes aegypti* estos tres taxa no suman el 6% de la diversidad observada y los mas abundantes en esta especie son *Stenotrophomona* (14%) un genero indefinido de Enterobacteriaceae (Enterobacteriaceae1) (12%) *Acinetobacter* (8 7%) *Serratia* (8 2%) y *Pseudomonas* (7%) sumando un 50% de la diversidad total (Fig 3) Cuatro OTUs se encontraron exclusivamente en *Aedes albopictus* mientras que *Aedes aegypti* presento 15 OTUs exclusivos (Cuadro 3) entre ellos cuatro generos identificados como *Streptomyces* *Blastochloris* *Proteus* y *Legionella*

La bacteria endoparasita *Wolbachia* aparecio en 39 de las 179 muestras analizadas 13 de ellas de *Aedes aegypti* (8 pools y 5 individuos) y 26 de *Aedes albopictus* (19 pools y 7 individuos) Se hallo en las provincias de Chiriqui (3 criaderos de talleres 2 de residencias) Herrera (1 en taller) Los Santos (13 en residencias) Panama (1 en residencia 8 en talleres) y Veraguas (1 en residencia y 1 en taller) (Fig 5)

1 4 3 2 Residencias y Talleres

Las muestras provenientes de residencias y las provenientes de talleres compartieron 181 OTUs Mientras que solo dos OTUs fueron exclusivos de talleres se encontraron 51 asociados unicamente a residencias (Fig S8) Hubo una diferencia estadisticamente significativa en la diversidad entre residencias y talleres (W = 1322 p valor = 0 001) Los indices de diversidad y equidad fueron mayores en residencias que en talleres (Residencias H = 3 32 J = 0 61 vs Talleres H = 3 12 J = 0 57) En los talleres el genero *Acinetobacter* fue el mas abundante representando un 19 5% de la diversidad

total, seguido de tres Comamonadaceae con las que suma el 50% de la diversidad total encontrada. En residencias, *Xanthobacter* es el taxa más abundante (19%), seguido de *Stenotrophomonas* (9%), Comamonadaceae1 (8%), Enterobacteriaceae1 (6.5%), *Novispirillum* (6%) y *Acinetobacter* (5%), con los que compone más del 50% de la diversidad total en residencias (Fig. 6). *Wolbachia* ocurrió en talleres con una abundancia del 1.7%, mientras que en residencias apenas alcanzó el 0.1%.

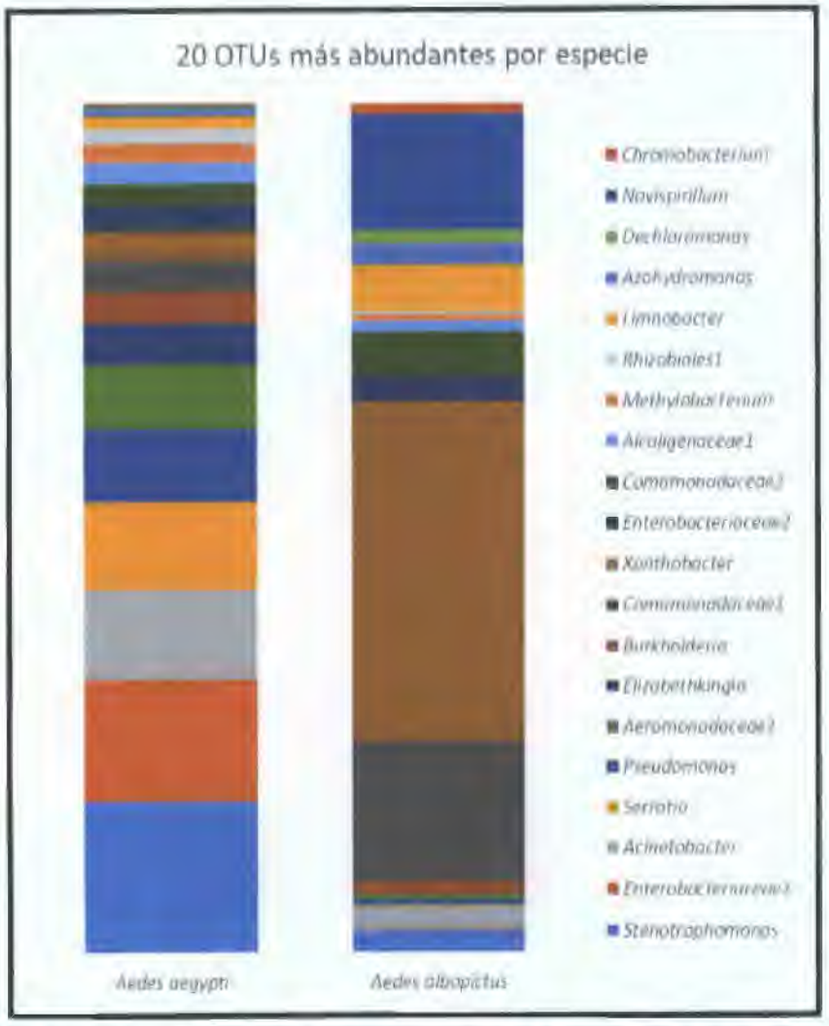


Figura 4. Los 20 OTUs más frecuentes en *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus*.

Cuadro 3 Indices de Shannon Wiener (H) y Equidad de Pielou (J) de la comunidad microbiana en las categorías estudiadas

	H	J
Especies		
Aedes aegypti	3 40	0 62
Aedes albopictus	2 56	0 47
Lugar		
Residencias	3 32	0 61
Talleres	3 12	0 57
Tipo de criadero		
Llantas	3 42	0 63
Tanques plasticos	3 22	0 59
Materia vegetal	1 60	0 29
Otros	2 81	0 52
Estadio		
A aegypti (Larva)	3 74	0 68
A aegypti (Adulto)	2 99	0 55
A albopictus (Larva)	1 84	0 34
A albopictus (Adulto)	2 60	0 48
Temperatura		
Baja	1 25	0 23
Media	3 13	0 58
Alta	3 63	0 67
pH		
Bajo	3 20	0 59
Medio	2 87	0 53
Alto	3 52	0 65

1 4 3 3 Tipo de criadero

Existe una diferencia significativa entre la composicion de taxa microbianos entre los distintos tipos de sitios de cria (R = 0 09 p valor = 0 001) El 44% de los OTUs estuvieron presentes en todos los sitios de cria analizados mientras que un 42 3% fue hallado tanto en llantas como en contenedores de agua y otros recipientes artificiales pero no en material vegetal El 13 7% restante corresponde a OTUs exclusivos de cada tipo de criadero o compartidos por 2 o 3 tipos en distintas combinaciones (Fig S8)

Tanto la diversidad como la equidad variaron ampliamente entre los distintos tipos de criadero (Cuadro 3) siendo los mas diversos las llantas (H = 3 42) y los tanques plas ticos (H = 3 22)

1 4 3 4 Larva y adulto

Un total de 198 OTUs estuvieron presente en tanto en la fase larvaria como en la fase adulta de *Aedes aegypti* (Fig S8) El indice de Shannon Wienner sugiere una di versidad mas alta en larvas en contraposicion a los adultos (H de 3 74 y 2 99 respecti vamente) aunque las diferencias no parecen ser estadisticamente significativas (W = 510 p valor = 0 36) La equidad fue superior en larvas (0 68 para larvas y 0 55 para adultos) Los taxa mejor representados en larvas fueron Aeromonadaceae (13 6%) *Ste notrophomonas* (12 2%) y Alcaligenaceae (5 6%) que en adultos supusieron un 3 15 y 0 5% respectivamente Los adultos presentaron principalmente Enterobacteriaceae (15 6%) *Stenotrophomonas* (15 2%) *Serratia* (11 8%) *Acinetobacter* (11%) y *Pseu domonas* (8 5%) grupos que a excepcion de *Stenotrophomonas* fueron bastante po bres en larvas (Fig 8)

Con respecto a *Aedes albopictus* ambos estados de desarrollo compartieron 170 OTUs (Fig S8) La diversidad en este caso fue menor en larvas que adultos (H de 1 84 y 2 60 respectivamente) aunque igualmente esta diferencia no fue estadisticamente sig nificativa (W = 473 p valor = 0 19) La equidad fue de 0 34 para larvas y 0 48 para adultos El genero *Xanthobacter* supuso en torno al 65% de toda la diversidad encon trada en larvas mientras que el mismo genero disminuyo al 29% en adultos aunque siguio siendo el mas abundante junto a Comamonadaceae (22 2%) (Fig 9)

Figura 5. Presencia de *Wolbachia*. Azul: *Aedes aegypti*; Amarillo: *Aedes albopictus*; Rojo: Ambas especies.

Figura 6. Los 20 OTUs más frecuentes en los talleres y residencias muestreados

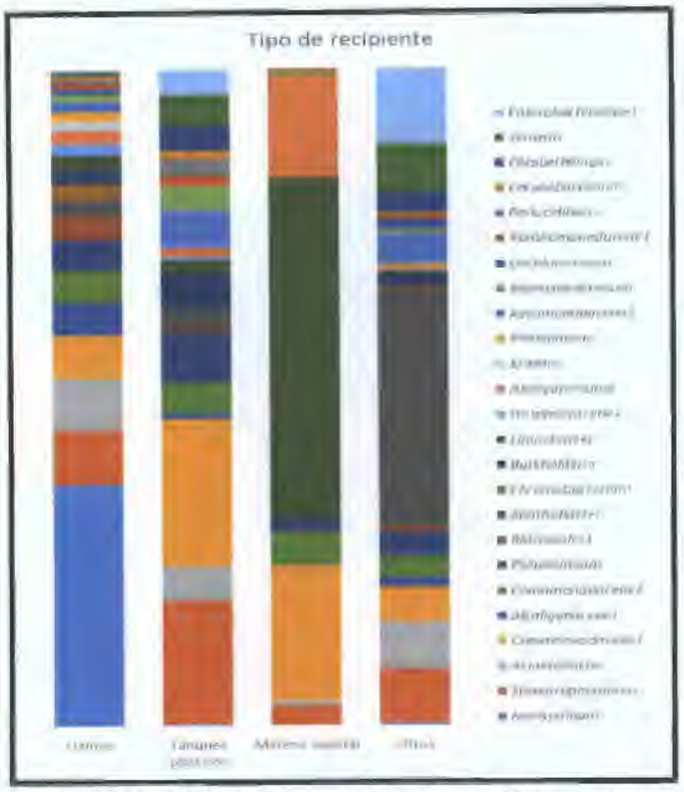


Figura 7. Diversidad microbiana a nivel de género en diferentes materiales como sitios de cría

Figura 8. Los 20 OTUs más abundantes en larvas de *Aedes aegypti* en comparación con sus frecuencias en adultos.

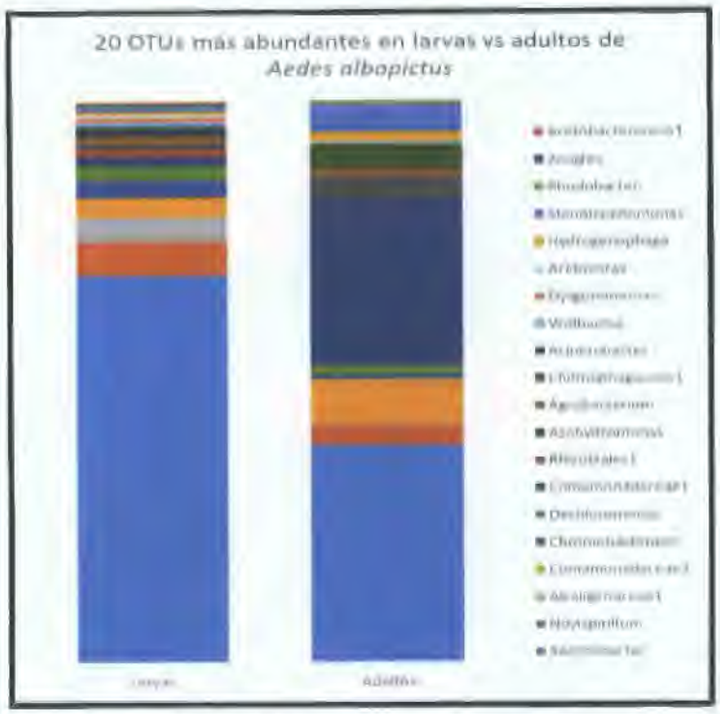


Figura 9. Los 20 OTUs más abundantes en larvas de *Aedes albopictus* en comparación con sus frecuencias en adultos.

1.4.3.5 Temperatura y pH

Los cambios en la abundancia de OTUs fueron comparados con los cambios en la temperatura y pH del agua donde los especímenes fueron recolectados. Pocos de estos cambios parecen guardar una relación con el gradiente de temperaturas muestreado (Cuadro 4), y ninguno con el pH, lo que indica que, para los rangos de temperatura y pH muestreados, la comunidad bacteriana no cambia significativamente.

Cuadro 4. Relaciones significantes entre la abundancia de OTUs con respecto a la temperatura

OTU	r	p valor (FDR)
Comamonadaceae1	0.350	0.002
Enterobacteriaceae1	0.331	0.004
Pseudomonadaceae1	0.324	0.005
Streptococcus	0.287	0.032
Comamonadaceae2	0.283	0.0[illegible]2

Resultados del analisis de correlacion de Pearson

CAPÍTULO II

ASOCIACIÓN DE *AEDES AEGYPTI* Y *AEDES ALBOPICTUS* CON TALLERES PARA LA COMPRA Y VENTA DE LLANTAS USADAS EN PANAMÁ

SISTEMA DE BIBLIOTECAS DE LA
UNIVERSIDAD DE PANAMA
(SIBI'DI)

2 1 Marco teorico

2 1 1 Patrones de migracion natural

La capacidad de dispersion de los mosquitos vectores es esencial para entender la dinamica de transmision de enfermedades ya que el rango de vuelo y la dispersion determinan la dinamica poblacional del vector la estructura genetica y la transferencia de los patogenos en la poblacion del vector (Service 1997)

Los estudios realizados para estudiar el movimiento y la capacidad de dispersion de *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus* se han basado principalmente en tecnicas de Captura Marcaje Liberacion y Recaptura (CMLR) y marcaje mediante Rubidio aunque algunos investigadores han probado tecnicas de marcaje genetico (Bond *et al* 1970 Hausermann *et al* 1971) Reiter & colaboradores (1995) marcaron hembras de *Aedes aegypti* con rubidio el cual puede rastrearse en los huevos que depositan Estos investigadores encontraron huevos a distancias de hasta 3 600 metros desde el punto de liberacion en San Juan Puerto Rico Años despues Honorio & colegas (2003) utilizaron la misma tecnica para observar la distancia maxima de dispersion de *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus* en Rio de Janeiro Brasil el cual estimaron en 800 metros aunque antes de ello eliminaron posibles criaderos de la zona Liew & Curtis (2004) realizaron un experimento similar en Singapur donde observaron distancias recorridas de no mas de 320 m para ambas especies Estos autores instalaron ovitrampas en el area de muestreo la cual limpiaron de otros contenedores para incrementar la oviposicion en las ovitrampas

Harrington & colaboradores (2005) llevaron a cabo experimentos de CMLR de *Aedes aegypti* por 11 años en Puerto Rico y Tailandia y la distancia maxima de desplazamiento que registraron fue de 512 metros En 2009 David & otros estudiaron la dispersion de *Aedes aegypti* en una zona endemica de dengue en Rio de Janeiro mediante CMLR donde los mosquitos no viajaron mas de 263 metros Maciel de Freitas & colaboradores (2009 2010) realizaron experimentos de CMLR y describieron que el 90% de las hembras recapturadas cubrieron una distancia de hasta 500 metros Estos autores concluyeron que las hembras cubrian mayores distancias si la densidad de sitios para ovipositar es baja mientras que permaneceran cercanas a donde se criaron si hay suficientes sitios de ovoposicion disponibles

Marini y colaboradores (2010) mediante un experimento de CMLR de *Aedes albopictus* en Roma Italia estimaron una distancia media de recorrido de 120 m siendo la distancia maxima observada de 290 m El mismo año y tambien en Italia Bellini & colaboradores realizaron un experimento similar enfocado en la dispersion de *Aedes albopictus* y recapturaron individuos alejados hasta 350 metros del punto de liberacion En 2014 Berdonschot & Besse Lototskaya realizaron una extensa revision de literatura sobre la distancia de vuelo cubierta por distintos generos de la familia Culicidae Con todos los datos recopilados establecen una distancia maxima para los mosquitos del genero *Aedes* de casi 3 km aunque basandose en trabajos con la tecnica de CMLR la distancia de vuelo media para *Aedes aegypti* disminuye a 83 4 m y la de *Aedes albopictus* a 75 m

Mas recientemente Medeiros & colaboradores (2017) utilizaron una tecnica de marcaje de larvas de *Aedes albopictus* mediante isotopos de Carbono 13 y Nitrogeno 15 despues de lo cual capturaron casi el 100% de las hembras adultas en un kilometro de su sitio de cria con el 79% dentro de 250 m

En conclusion los resultados sobre los trabajos de dispersion de *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus* son variados y no muestran de valores consensuados en cuanto a la distancia de dispersion natural de estos mosquitos No obstante en condiciones naturales y sin ningun tipo de manipulacion del habitat parece que un especimen de *Aedes aegypti* no se dispersa mas de 500 metros durante su vida Ademas el tipo de habitat influiria en la dispersion ya que de acuerdo a Lacorix & otros investigadores (2009) *Aedes albopictus* prefiere desplazarse en corredores de vegetacion en vez de cruzar espacios abiertos

2 1 2 Migracion de *Aedes* asistida por humanos

La invasion y expansion de *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus* a nivel mundial ha sido mediada por el ser humano *Aedes aegypti* llego por primera vez al continente americano en barcos esclavistas europeos provenientes de Africa (Uribe 1983) y con el se introdujo el virus de la fiebre amarilla cuyo primer brote confirmado pudo ser Yukatan en 1648 o Haiti en 1495 (Powell & Tabachnick 2013) Se estima que *Aedes albopictus* invadio los Estados Unidos en 1980 (Sprenger & Wuithiranyagool 1986) no obstante existen reportes de su existencia en el continente a mediados de los años cuarenta Larvas vivas de esta especies fueron encontradas en material militar procedentes de Filipinas tras la Segunda Guerra Mundial (Pratt *et al* 1946)
Hoy en dia *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus* se encuentran presentes en todos los continentes a excepcion de la Antartida y se considera que el transito y comercio internacional de llantas usadas donde ambas especies se crian ha sido el principal vehiculo

para su colonizacion global En 1987 Reiter & Spienger publicaron datos sobre la exportacion de llantas usadas por via maritima entre 1978 y 1985 donde el numero ascendio a mas de 11 5 millones de llantas exportadas a nivel mundial solo desde los Estados Unidos de America Los autores sugieren que debido al rapido avance de las tecnologias y la construccion de navios mas grandes tales cifras aumentarian exponencialmente en años proximos

En 1998 Reiter publico otro trabajo sobre el comercio internacional de llantas usadas y la expansion de *Aedes albopictus* desde Japon hacia Norte America Tambien realiza una extensa descripcion de datos de importacion y exportacion de llantas usadas desde y hacia multiples paises de America Asia y Europa Reiter finaliza como ya hizo en la revision de 1987 con una vision negativa en la que el aumento del comercio internacional y la red de rutas comerciales provocara la introduccion de mas especies invasoras y la aparicion o reemergencia de enfermedades y muestra el ejemplo de Italia donde *Aedes albopictus* no ha llegado desde su origen asiatico sino de Estados Unidos convirtiendose asi las distintas regiones del planeta tanto en importadores como exportadores de vectores y patogenos

Yee (2008) realizo una revision de todos los trabajos publicados en los Estados Unidos de America desde 1930 sobre llantas usadas y mosquitos que se crian en ellas El autor reporto la presencia de *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus* y propuso que *Aedes albopictus* es mas abundante en llantas en el sur del pais

El transporte maritimo no es la unica via por la que estas y otras especies de mosquito pueden alcanzar nuevos territorios Se ha constatado en multiples ocasiones que el transporte aereo puede tambien ayudar a la dispersion de vectores En 1963 *Aedes vexans nocturnus* fue introducido en Hawaii probablemente por medio de transporte aereo (Joyce & Nakagawa 1963) En 1968 Pippin y colaboradores describieron como

varias larvas vivas de *Aedes aegypti* y *Culex cinereus* habian sido encontradas en un avion que aterrizo en Kansas Estados Unidos procedente de Africa Occidental Goh & Kumarapathy escribieron en 1985 sobre los mosquitos encontrados en aviones en el aeropuerto de Singapur entre los que se hallaban vectores tales como *Aedes aegypti* *Aedes albopictus* y *Culex quinquefasciatus* En 1987 Russell describio como especimenes de *Culex quinquefasciatus* sobrevivian en el compartimento de las llantas de aviones durante rutas internacionales entre Australia y el sudeste asiatico Mas recientemente Ramos y otros investigadores (2000) describieron la presencia de dos mosquitos adultos en la cabina de un avion procedente de Nueva York en el que viajaba el autor del articulo el cual fue picado por una hembra de *Aedes taeniorhynchus* el unico especimen que pudo capturar e identificar Scholte & colaboradores (2014) identificaron durante 2010 y 2011 especimenes de *Culex quinquefasciatus* *Culex antennatus* y *Aedes mcintoshi* en 10 aviones en el aeropuerto de Amsterdam procedentes de Africa

A una escala relativamente mas pequeña los mosquitos pueden utilizar medios de transporte terrestre para desplazarse En Europa se considera que individuos de *Aedes albopictus* entran en carros y camiones y son transportados por carretera (Vogel *et al* 2014) Aunque esta via no esta tan explorada como las vias maritima y aerea distintos estudios concluyen que las carreteras estan relacionadas con la dispersion de *Aedes albopictus* y *Aedes japonicus japonicus* en Estados Unidos (Medley *et al* 2015 Egizi *et al* 2016) En Panama Miller & Loaiza (2015) definieron a la red de carreteras del pais como el modelo que mejor explica la rapida dispersion y distribucion de *Aedes albopictus* recientemente introducido en el territorio

2 2 Objetivo

2 2 1 Estimar la frecuencia de ocurrencia y co ocurrencia de *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus* en talleres de llantas usadas en las principales carreteras de Panama

2 3 Materiales y metodos

2 3 1 Recolecta de mosquitos con ovitrampas

Las recolectas de mosquitos mediante ovitrampas se llevaron a cabo entre 2016 y 2017 en talleres de compra y venta de llantas usadas situados en las principales carreteras de Panama Previo a este muestreo durante los años 2015 y 2016 se realizo una exhaustiva campaña de geo referenciacion de talleres por todo el pais que culmino con 299 talleres relacionados con la compra y venta de llantas usadas (Fig 10)

El muestreo mediante ovitrampas tuvo como proposito principal recolectar huevos de *Aedes* para el analisis taxonomico mediante la tecnica de espectrometria de masas por MALDI TOF MS correspondiente a otro proyecto no recogido en este trabajo Las ovitrampas (o trampas de oviposicion) consistian en un recipiente negro pequeño en forma de cubo de no mas de 500 cc lleno hasta la mitad con agua del grifo En el agua se sumergia parcialmente una paleta de madera semejante a un depresor lingual que actuaba como sustrato para la oviposicion (Fig S4)

Con el consentimiento del propietario o propietaria en cada taller se desplegaron tres ovitrampas distanciadas entre si y por un periodo de siete dias con el fin de aumentar las posibilidades de colectar huevos Llegado el momento de cada taller se guardaron las paletas de madera en una bolsa *zip lock* y el agua de las ovitrampas en otra Esto se hizo ante la posibilidad de que algunos huevos hubiesen eclosionado antes de la recogida lo que permitiria obtener informacion sobre las especies presentes mediante

la cria de los especimenes Todo el material se transporto al laboratorio para su cria y preservacion

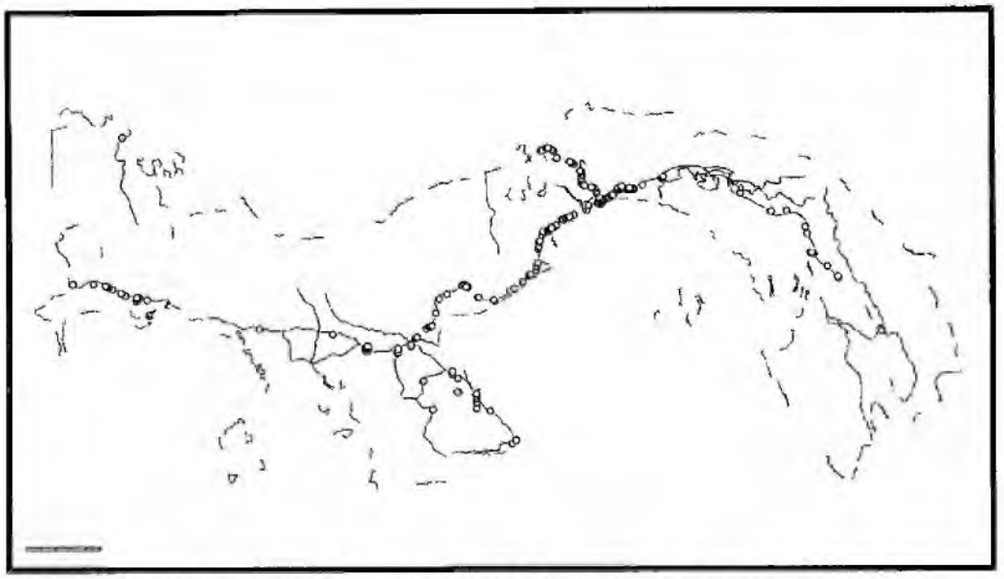


Figura 10 Total de talleres de compra y venta de llantas usadas georreferenciados du rante los anos 2015 y 2016 (N = 299)

2 3 2 Cria y manejo de especimenes en laboratorio

El agua de las ovitrampas recogida en las bolsas *zip lock* fue traspasada a camaras de emergencia donde los especimenes se desarrollaron a temperatura ambiente hasta la emergencia de los adultos El proceso de manejo identificacion y preservacion de los especimenes fue identico al descrito en el primer capitulo de este trabajo a excep cion de que todos los especimenes se desarrollaron hasta el estado adulto antes de ser conservados

En cuanto a las paletas de madera se examinaron bajo estereoscopio para confirmar la presencia o ausencia de ovipostura en cada tallo (Fig. S8) y tras secarse las paletas fueron conservadas a 20°C

2.3.3 Analisis de co ocurrencia

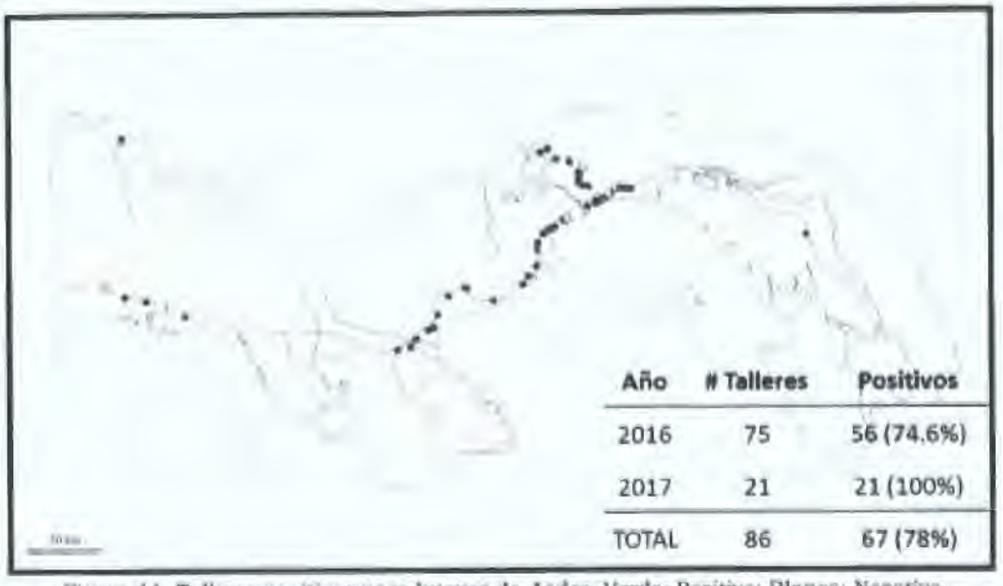
Se usaron modelos probabilisticos para estudiar la co ocurrencia de las especies mediante el paquete de R cooccur (Griffith *et al.* 2016). Este modelo permite calcular la probabilidad *(P)* de que dos especies co ocurrieran a una frecuencia menor (P_{lt}) o mayor (P_{gt}) que la frecuencia de co ocurrencia observada en los sitios de cria si las dos especies se distribuyeran independientemente una de la otra. Si $P_{lt} < 0.05$ dos especies tienen una co occurrencia negativa y si $P_{gt} < 0.05$ hay una co occurrencia positiva entre las dos especies.

2 4 Resultados

En total se muestrearon 101 talleres de compra y venta de llantas usadas mediante ovitrampas y/o busqueda activa De estos 57 fueron muestreados unicamente mediante ovitrampas 15 por busqueda activa y 29 por ambos metodos Es decir se colocaron ovitrampas en 86 talleres diez de los cuales fueron muestreados tanto en 2016 como en 2017 (Cuadro S5)

En 2016 se muestrearon 75 talleres mediante ovitrampas en 56 de los cuales se encontraron huevos de *Aedes* (74 6%) En 2017 se encontraron huevos en el 100% de los 21 talleres muestreados (Fig 11 Cuadro S5)

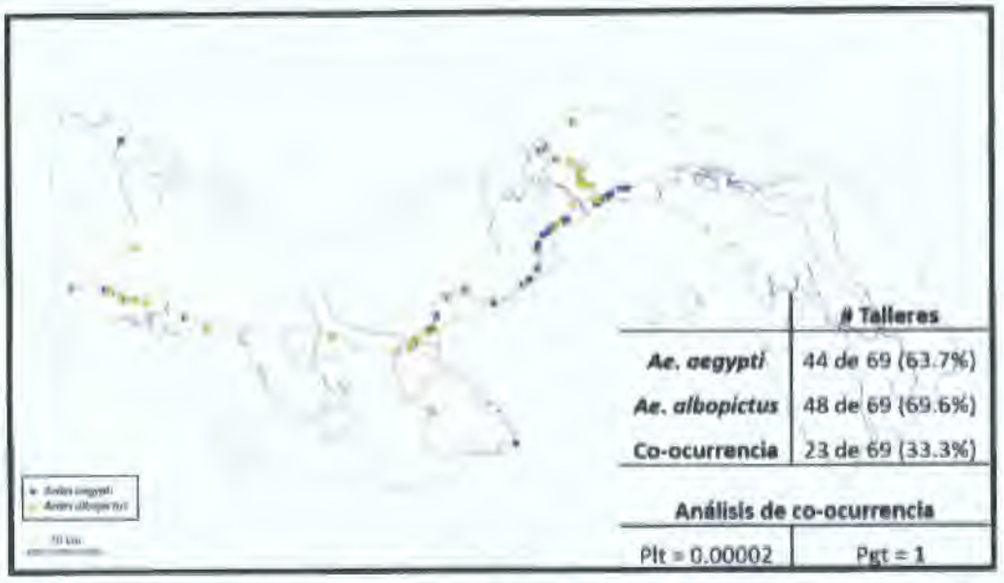
Como se explico en la metodologia las ovipostuas se retiraron del agua antes de la eclosion para utilizar los huevos en un proyecto paralelo no incluido en esta disertacion La informacion a nivel de especie obtenida de las ovitrampas se corresponde a aquellos huevos que eclosionaron previo a la recuperacion de las trampas Asi de los 67 talleres en los que se encontraron ovipostuas 50 contenian larvas y por tanto se pudo obtener informacion a nivel de especie



Año	# Talleres	Positivos
2016	75	56 (74.6%)
2017	21	21 (100%)
TOTAL	86	67 (78%)

Figura 11. Talleres positivos para huevos de *Aedes*. Verde: Positivo; Blanco: Negativo

Al final, entre la búsqueda activa y las ovitrampas, se obtuvo información a nivel de especie en 69 talleres. *Aedes aegypti* estuvo presente en 44 (63.7%), mientras que *Aedes albopictus* en 48 (69.6%). Ambas especies coocurrieron en el 33.3% de los talleres (Fig. 12). *Aedes albopictus* fue ligeramente más frecuente, aunque su distribución no parece ser homogénea a lo largo de la autopista interamericana. A juzgar por los datos mostrados en la Fig. 6, *Aedes albopictus* parece dominar desde la frontera con Costa Rica hasta la localidad de Aguadulce, donde *Aedes aegypti* comienza a ganar presencia y domina casi en exclusividad hasta Ciudad de Panamá. Dentro de la ciudad, ambas especies están presentes, aunque *Aedes aegypti* aparece con mayor frecuencia. A lo largo de la carretera transístmica, *Aedes albopictus* es la única especie presente.



	# Talleres
Ae. aegypti	44 de 69 (63.7%)
Ae. albopictus	48 de 69 (69.6%)
Co-ocurrencia	23 de 69 (33.3%)

Análisis de co-ocurrencia	
Plt = 0.00002	Pgt = 1

Figura 12. Presencia de *Aedes aegypti* y/o *Aedes albopictus* en ovitrampas y sitios de cría de talleres de compra y venta de llantas usadas.

2.4.1 Análisis de co-ocurrencia

El análisis indica una coocurrencia negativa (P_{lt} = 0.00002; P_{gt} = 1), es decir, que ambas especies parecen excluirse mutuamente.

CAPITULO III

DISCUSION CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

3 1 Discusion

Este proyecto tuvo como objetivo conocer las condiciones del habitat en las que *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus* se crian asi como su ocurrencia en talleres de compra y venta de llantas usadas donde ambas especies tienden a criarse

3 1 1 Variables fisico quimicas del habitat larval

Los resultados indican que *Aedes aegypti* puede criarse indistintamente en todo el rango de temperatura muestreado mientras que *Aedes albopictus* preferiria valores menores dentro del intervalo Estos resultados concuerdan con la literatura disponible donde se estima una temperatura umbral minima para *Aedes albopictus* mas baja que para *Aedes aegypti* (Tsuda & Takagi 2001) Asi mismo la distribucion latitudinal actual de ambas especies sugiere que *Aedes albopictus* es capaz de soportar temperaturas mas bajas que *Aedes aegypti* ya que el primero invade regiones templadas del globo donde el segundo no esta presente actualmente (Kraemer *et al* 2015) *Aedes aegypti* es por el momento incapaz de alcanzar latitudes templadas donde la variacion anual de temperatura es mas acusada que en las regiones tropicales donde se mantiene relativamente alta a lo largo del ano El intervalo de temperatura estudiado representa en gran medida las temperaturas encontradas en todo el territorio panameño a excepcion de la registrada en altitudes elevadas donde apenas se muestreo Esto quiere decir que en cuanto a temperatura se refiere estas especies de mosquitos pueden potencialmente alcanzar todas las regiones habitadas del pais a excepcion tal vez para *Aedes aegypti* de

las regiones de mayor altitud donde el muestreo realizado no fue suficiente como para sacar conclusiones si bien es cierto que en los lugares muestreados en tierras altas como Volcan y Boquete en Chiriqui o Santa Fe en la provincia de Veraguas solo se encontro *Aedes albopictus*

El pH no parece tener un efecto significativo en la presencia de ninguna de las especies pues ambas son capaces de criarse en la amplitud del intervalo estudiado desde valores bastante acidos hasta muy alcalinos Estos resultados confirman una vez mas la gran habilidad de las larvas de estas especies en regular su pH interno visto anteriormente en numerosos trabajos como los descritos al comienzo del capitulo De hecho algunos autores consideran a los mosquitos son los animales mas eficaces en la autorregulacion del pH (Clark *et al* 2004) El uso indiscriminado de habitats de tan diversos niveles de acidez y alcalinidad supone una enorme ventaja para estas especies y un serio problema para el ser humano ya que demuestra la enorme variabilidad en las condiciones fisico quimicas del agua en la que ambas especies vectores pueden desarrollarse con un efecto directo en su distribucion dispersion y en su papel como vectores

3 1 2 Composicion bacteriana

El conocimiento de la microbiota en vectores de enfermedades humanas es esencial para comprender las relaciones con los patogenos que transmiten Hasta el momento de todo lo que recoge la literatura este es el mayor muestreo de diversidad microbiana en *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus* y el primero en comparar la composicion de la microbiota en ambos vectores y relacionarlo con la fisico quimica del habitat larval Ademas es la segunda vez tras el trabajo de Coon y colaboradores (2016) que *Wolbachia* es encontrada en poblaciones salvajes de *Aedes aegypti*

Los Phyla mas abundantes encontrados fueron *Proteobacteria Bacteroidetes Actinobacteria* y Firmicutes Estos resultados son similares a los obtenidos en otros estudios de analisis de la composicion microbiana relacionada con mosquitos donde estos mismos grupos fueron tambien los mas prevalentes (Duguma 2013 Gimonneau *et al* 2014 Coon *et al* 2016)

Si bien la composicion en terminos de OTUs es muy similar en ambas especies ya que comparten la mayoria de los taxa encontrados la abundancia relativa de estos difiere entre *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus* La proporcion de *Xanthobacter* es muy superior en *Aedes albopictus* en comparacion con *Aedes aegypti* Sin embargo la abundancia relativa de este genero no es homogenea dentro de todas las muestras analizadas La mayor influencia en la proporcion de *Xanthobacter* en *Aedes albopictus* viene de un mismo sitio de cria en Tonosi en la provincia de Los Santos mientras que en el resto de sitios mantiene una proporcion relativamente baja Ocurre lo mismo con Comamonadaceae1 muy abundante en un criadero de El Cacao tambien en Los Santos pero menos abundante en la mayoria del resto de sitios De esto se concluye que aun compartiendo los mismos OTUs entre especies y a lo largo de los distintos sitios de cria la abundancia relativa de cada taxa puede ser muy diferente y mediada por distintos factores Esta gran diversidad microbiana y la variabilidad encontrada apoya las afirmaciones de Coon y colaboradores (2016) que sugieren que *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus* no contienen una composicion microbiana estrechamente definida ya que los distintos tipos de habitats pueden contener diferentes especies microbianas que las larvas son capaces de explotar

En cuanto al estadio de desarrollo los resultados muestran que la comunidad microbiana en individuos adultos no difiere significativamente de la encontrada en larvas tanto para *Aedes aegypti* como para *Aedes albopictus* El resultado cae dentro de lo

esperado teniendo en cuenta que los adultos analizados fueron sacrificados poco des pues de emergen sin permitirles alimentarse de sangre o azucares lo cual si dispara un cambio en la diversidad microbiana tal como vieron Wang y colaboradores (2011) en *Anopheles gambie*

Las llantas usadas y los tanques de agua parecen ser los habitats mas diversos en microbiota No obstante fueron tambien los habitats encontrados con mayor frecuencia y por ende el desbalance en tipos de habitats muestreados puede estar influenciando estos resultados La baja diversidad de taxa en los habitats formados por materia vegetal puede deberse a que fueron pocos los muestreados y por tanto no se logro acumular toda la diversidad existente en sitios de cria similares Estos resultados mostrando una diferencia significativa en la diversidad entre tipos de habitats difiere de los encontra dos por Ponnusamy y colaboradores (2008) que no vieron diferencias entre los tipos de contenedores que muestrearon (llantas urnas de cementerio y otros recipientes arti ficiales y naturales) Su estudio difiere no obstante en un menor tamaño muestral y en que analizaron la comunidad microbiana en el agua y no en mosquitos Kaufman y otros investigadores (1999) describieron que la presencia de larvas dispara un cambio en la abundancia y diversidad de bacterias en un habitat lo que podria llevar a diferenciar la composicion de habitats similares antes de la infestacion por larvas

Los sitios de cria encontrados en residencias familiares fueron mas ricos en terminos de diversidad microbiana No obstante esta aparente mayor diversidad puede estar en mascarada debido a un mayor esfuerzo de muestreo en residencias con respecto a talle res asi como a la mayor variedad de habitats muestreados en residencias (contenedores plasticos materia vegetal objetos variados) en comparacion a los muestreados en talle res que fueron en su inmensa mayoria llantas usadas las cuales no varian significati vamente unas de otras a excepcion de los diferentes tamaños que pueden encontrarse

En cuanto a la temperatura y el pH tuvieron muy poca o ninguna influencia en la composicion de la comunidad microbiana encontrada y solo algunos OTUs parecen ligeramente correlacionados con la variacion termica El nulo efecto del pH sobre la comunidad microbiana difiere de lo encontrado por Lindstrom (2000) que definio el pH como una de las variables ambientales relacionadas con la composicion de la comunidad bacteriana en lagos Booth (1985) indica por el contrario que las bacterias en general son capaces de mantener la homeostasis aun tras cambios en el pH ambiental lo que apoyaria los resultados obtenidos que los taxa encontrados se distribuyen independientemente el pH Ademas hay que tener en cuenta que la comunidad bacteriana estudiada estaba contenida en el interior de mosquitos en estado de larva y adulto es decir el pH al que estaban sometidos los taxa identificados no se correspondia al ambiental sino al pH en el interior de los especimenes

Es interesante ver que en los adultos de *Aedes aegypti* dos de los taxa mas abundantes fueron una Enterobacteriaceae y *Serratia* las cuales contribuyen a la hemolisis y facilitan la digestion sanguinea (De o Gato *et al* 2011) mientras que en larvas estos taxa fueron escasos *Serratia* es ademas un genero importante a tener en cuenta ya que algunas de las especies que incluye interfieren en la capacidad vectorial de los mosquitos Por ejemplo se ha comprobado que *Serratia odorifera* aumenta la susceptibilidad de *Aedes aegypti* a la cepa 2 del virus del dengue (Apte Desphande *et al* 2012) Por otro lado parece que *Serratia marcescens* puede inhibir el desarrollo de *Plasmodium* en *Anopheles* (Brindo *et al* 2013) Esta misma especie parece capaz de producir una prodigiosina con efecto larvicida contra *Aedes aegypti* y *Anopheles stephensi* (Patil *et al* 2011) *Serratia* es asi un grupo de bacterias de especial interes ya que algunas de sus especies podrian ser utilizadas como agentes para el control de mosquitos o de los propios patogenos que estos transmiten

La bacteria endoparasita *Wolbachia* aparecio en ambas especies tanto en residencias como en talleres Este trabajo es la segunda ocasion en que *Aedes aegypti* se encuentra infectado por *Wolbachia* de forma natural Coon y colaboradores la encontraron en algunos especimenes de esta especie en Florida en 2016 aunque no le dieron mayor importancia al ser un hallazgo secundario en su trabajo y tal es asi que la comunidad cientifica aun considera *Aedes aegypti* libre de infeccion por *Wolbachia* de forma natural (Pan *et al* 2017) Nosotros no solo encontramos *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus* infectados con *Wolbachia* sino que se encontro en multiples puntos a lo largo del pais e incluso en criaderos donde co ocurrieron ambas especies La infeccion de *Aedes albopictus* por *Wolbachia* encontrada parece no obstante muy inferior en abundancia a la hallada en trabajos como el de Muturi y colaboradores (2017) en Illinois EEUU donde la microbiota de todos los especimenes de *Aedes albopictus* analizados estuvo dominada por *Wolbachia* o el trabajo de Ioanne y otros investigadores (2017) en Malasia donde afirman que mas del 90% de la poblacion de *Aedes albopictus* presenta una superinfeccion con *Wolbachia* Los bajos niveles de infeccion por *Wolbachia* en *Aedes albopictus* en Panama podria deberse tal vez a un reciente contacto de la bacteria con el mosquito la cual se encontraria actualmente en proceso de invasion De cualquier manera estos niveles de infeccion bajos podrian ser una oportunidad excelente para poner a prueba experimentos de liberacion de mosquitos con cepas mas efectivas como *w*Mel ya que al no encontrarse otras cepas en el grueso de la poblacion no entraria en conflicto y las posibilidades de exito serian mayores

3 1 3 *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus* en talleres de llantas usadas

Los mosquitos del genero *Aedes* estuvieron presentes en el 100% de los talleres de compra y venta de llantas usadas muestreados en 2017 y en el 74 6% de los muestreados en 2016 El porcentaje de 2016 no obstante podria encontrarse subestimado debido a que la semana de muestreo en la provincia de Chiriqui de donde provienen la mayoria de los talleres negativos coincidio con el paso del huracan Otto cerca de la costa atlantica de Panama que dejo fuertes y continuas lluvias que pudieron impedir a las hembras volar y ovipositar De no haber sido por esta variable climatica la ocurrencia de *Aedes* en 2016 habria sido mayor

De una manera u otra en conjunto alrededor del 81% de los talleres muestreados en los dos años fueron positivos para huevos de *Aedes* Teniendo en cuenta que se muestrearon 101 de los aproximadamente 300 talleres ubicados en las principales carreteras del pais es decir un tercio del total el resultado puede considerarse representativo de la situacion actual en Panama Muchos de los talleres muestreados se encuentran alejados por kilometros del nucleo poblacional mas cercano y sin embargo se encuentra infestados con *Aedes aegypti* y/o *Aedes albopictus*

La presencia de ambas especies en estos talleres en los que la presencia humana es muy escasa y estan rodeados por territorios inhabitados es dificilmente explicable por mecanismos de dispersion naturales Esta alta prevalencia en los talleres podria facilitar el transporte de ambas especies en llantas Varios estudios ya han considerado la dispersion pasiva de *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus* facilitada por el transporte vehicular en las carreteras como el de Medley y colaboradores (2015) donde confirman el papel de la red de carreteras del este de EEUU en la dispersion de *Aedes albopictus* o mas recientemente Medlock y otros investigadores (2017) que informan de la expansion de

Aedes albopictus mediante la red de carreteras francesas y advierten de la posibilidad de la llegada a Inglaterra por medio de vehiculos

Los resultados obtenidos apoyan el modelo descrito por Miller & Loaiza (2015) donde propusieron la red de carreteras de Panama como el modelo que mejor explica la rapida expansion de *Aedes albopictus* Su modelo predictivo ademas acerto en la expansion de la poblacion de *Aedes albopictus* hacia la peninsula de Azuero la region pacifica de la provincia de Cocle e incluso la provincia de Darien en la que *Aedes albopictus* estaba ausente en 2016 y sin embargo se encontro ampliamente distribuido en la localidad de Meteti durante muestreos realizados en 2017

Aunque *Aedes albopictus* fue encontrada en mas talleres que *Aedes aegypti* (48 versus 44 respectivamente de los 69 muestreados con informacion a nivel de especie) la diferencia no es suficiente como para sacar conclusiones sobre que especie es mas eficaz en el uso de llantas usadas como vehiculo para su dispersion La heterogeneidad que se visualiza en su distribucion geografica asi como el patron de exclusion que arroja los resultados del analisis de coocurrencia parece indicar que la predominancia de una especie en un territorio con respecto a la otra esta condicionada por otros factores mas alla de su efectividad para criarse y viajar en llantas Estos resultados apoyan la teoria de la competicion dependiente de las condiciones ambientales segun la cual las ventajas de una especie sobre la otra dependen de las condiciones del habitat (Costanzo *et al* 2005) Asi mismo sugiere que un posible proceso de exclusion competitiva esta ocurriendo actualmente en Panama tal y como se ha descrito en Estados Unidos y otras regiones del mundo (Juliano *et al* 2004)

3 2 Conclusiones y recomendaciones

Las especies de mosquitos *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus* son cosmopolitas en cuanto a sus requerimientos de temperatura y pH durante su desarrollo larval para valores tipicos en regiones tropicales como Panama Su distribucion no obstante parece regirse por otros factores mas alla de las condiciones del habitat larval y probablemente tengan mas que ver con variables que afecten tambien a los adultos como pluviosidad humedad relativa o fuentes de sangre Un estudio mas detallado que incluya estas y otras variables en Panama seria valioso para tal vez prever la expansion de estas especies y posibles brotes de enfermedades

La rica diversidad microbiana encontrada en los especimenes recolectados en sitios de cria pone de manifiesto la enorme cantidad de interacciones que se dan durante el ciclo de vida del mosquito Las bacterias son utilizadas como alimento por las larvas y algunas de esas bacterias terminan infectando el tracto digestivo aparato reproductor y otros organos provocando distintos efectos en los individuos que las portan No obstante el papel que juega la mayoria de la microbiota encontrada habitualmente en estas especies es aun desconocido y aunque posiblemente muchas de ellas no tengan ningun efecto directo sobre el mosquito podrian interaccionar con patogenos aumentando o disminuyendo la capacidad vectorial o interferir en la aplicacion de metodos de control como la introduccion de *Wolbachia* en una poblacion a tratar

La presencia de *Wolbachia* en *Aedes aegypti* aporta informacion muy valiosa a tener en cuenta ante los proyectos de control mediante la liberacion de mosquitos infectados

con la cepa *w*Mel que se estan llevando a cabo en algunas partes del mundo La presencia de cepas de *Wolbachia* en poblaciones salvajes de *Aedes aegypti* podria hacer fracasar este metodo ante la interaccion negativa de distintas cepas Varias preguntas surgen de este hallazgo ¿Llego *Wolbachia* con *Aedes albopictus* cuando este invadio Panama? ¿Es la infeccion por *Wolbachia* de *Aedes aegypti* fruto de su interaccion con *Aedes albopictus* o presentan cepas diferentes? ¿Influyen esta cepa o cepas en el desarrollo y exito reproductivo de los especimenes infectados? Dado que no se ha encontrado *Wolbachia* en las regiones del pais donde solo se encuentra *Aedes aegypti* cabria pensar que la infeccion de esta especie podria tener su origen en la interaccion interespecifica bien sea por su co ocurrencia en lugares de cria o por intentos de copula interespecificos donde la bacteria puede ser transmitida sexualmente Por esclarecer esto seria conveniente la secuenciacion genomica de la cepa o cepas encontradas tanto en *Aedes aegypti* como en *Aedes albopictus* para identificar si son cepas no conocidas hasta ahora o por el contrario han sido ya identificadas en *Aedes albopictus* u otras especies

Los talleres de compra y venta de llantas usadas suponen un problema serio para el control de *Aedes aegypti* y *Aedes albopcitus* y por ende para la salud publica Si bien debido a la naturaleza del muestreo y los datos recogidos este trabajo no demuestra que estas especies esten utilizando las carreteras sirviendose del transporte de llantas usadas para su dispersion si aporta datos empiricos sobre la infestacion de los talleres que comercian con estas llantas a lo largo y ancho del pais tanto en localidades como en sitios remotos con escasa densidad poblacional El paso siguiente para corroborar este metodo de dispersion seria el muestreo activo de vehiculos transportando llantas en la carretera Por ejemplo servirse de los puestos de control de vehiculos localizados en la

carretera interamericana para examinar las llantas que se transportan en busca de estadios inmaduros Asi mismo un analisis de flujo genico en talleres y residencias podria ayudar a esclarecer si esta ruta de dispersion de verdad es habitual caso en el cual las tasas de flujo genico serian mayores a lo largo de la carretera que entre localidades alejadas de esta Seria interesante tambien conocer la cepa o cepas de *Wolbachia* presentes en los talleres de compra y venta de llantas usadas ya que de ser la misma podria ser una prueba del desplazamiento de los mosquitos a traves de las carreteras

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

APTE DESHPANDE A PAINCANKAR, M GOKHALE M D, & DEO BAGKAR, D N 2012 *Serratia odorifera* a midgut inhabitant of *Aedes aegypti* mosquito enhances its susceptibility to dengue 2 virus *PLoS One* 7(7) e40401

BANDO, H OKADO K CUELBEOGO W M BADOLO A AONUMA H NELSON, B, & KANUKA H 2013 Intra specific diversity of *Serratia marcescens* in *Anopheles* mosquito midgut defines *Plasmodium* transmission capacity *Scientific reports* 3 1641

BARBER M A, & KOMP, W H W 1922 The Hydrogen ion Concentration of Waters in Relation to Anopheline Production In *Trans 4th Conf Malaria Field Workers Chattanooga Tenn Nov 14 16 1922 Public Health Bull 137*

BARRETT, A D, & HIGCS S 2007 Yellow fever a disease that has yet to be conquered *Annu Rev Entomol* 52 209 229

BAR ZEEV, M 1958 The effect of temperature on the growth rate and survival of the immature stages of Aedes aegypti (L) *Bulletin of Entomological Research* 49(1) 157 163

BAYOH, M N & LINDSAY S W 2003 Effect of temperature on the development of the aquatic stages of *Anopheles gambiae* sensu stricto (Diptera Culicidae) *Bulletin of entomological research* 93(5) 375 381

BAZO A, DESAI A, MOHAMED A PEREZ, S POWEL M SMITH A WEISBART, C & YAQUB H 2017 Survey of Mosquito Species Inhabiting Bryan & College Station Texas *Instars A Journal of Student Research* 3

BEKLEMISHEV V, & MITROFANOVA Y 1926 On the Ecology of the Larvae of *Anopheles maculipennis* Meig The Problem of Distribution *Bull Inst Rech biol Perm* 4 285 352

BELL H L 1971 Effect of low pH on the survival and emergence of aquatic insects *Water Research* 5(6) 313 319

BELLINI, R, ALBIERI, A BALESTRINO F CARRIERI M PORRETTA D, URBANELLI S & MAINI S 2014 Dispersal and survival of *Aedes albopictus* (Diptera Culicidae) males in Italian urban areas and significance for sterile insect technique application *Journal of medical entomology* 47(6) 1082 1091

BHAMI, C KANAGAPPAN, M & DAS S 2015 Adaptations of *Stegomyia aegypti* L and *Stegomyia Albopicta* Skuse to Water Current and pH *Acijmr* 3(8) 1 11

BLAGROVE, M S 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* 109(1) 255 260

BLAGROVE M S, ARIAS GOETA, C DI GENUA C, FAILLOUX A B, & SINKINS S P 2013 A *Wolbachia* wMel transinfection in *Aedes albopictus* is not detrimental to host fitness and inhibits Chikungunya virus *PLoS neglected tropical diseases* 7(3) e2152

BOKULICH N A SUBRAMANIAN S FAITH, J J GEVERS D GORDON, J I, KNIGHT R & CAPORASO J G 2013 Quality filtering vastly improves diversity estimates from Illumina amplicon sequencing *Nature methods* 10(1) 57 59

BOND H A & FAY R W 1970 Field mating and movement of *Aedes aegypti* *Mosquito News* 30(3) 394 402

BOOTH, I R 1985 Regulation of cytoplasmic pH in bacteria *Microbiological reviews* 49(4) 359 378

BRAKS M H HONORIO N A LOUNIBOS L P, LOURENCO DE OLIVEIRA R & JULIANO S A 2004 Interspecific competition between two invasive

species of container mosquitoes *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera Culicidae) in Brazil *Annals of the Entomological Society of America* 97(1) 130 139

BRUST, R A 1967 Weight and development time of different stadia of mosquitoes reared at various constant temperatures *The Canadian Entomologist* 99(9) 986 993

BUDDINGTON, A R 1940 Some studies in the nutrition and metabolism of the yellow fever mosquito *Aedes aegypti* L and the common house mosquito *Culex pipiens* L Part I A study of mosquito larvae nutrition in the relations to microorganisms the vitamins or accessory growth factors and the utilization of solutes by the larvae Part II The survival of the larvae in media of different concentrations of the hydrogen ion (Doctoral dissertation)

CAPORASO, J G, KUCZYNSKI, J, STOMBAUGH J BITTINGER K, BUSHMAN F D COSTELLO E K *ET AL* 2010 QIIME allows analysis of high throughput community sequencing data *Nature Methods* 7(5) 335–336

CAPORASO, J G LAUBER C, WALTERS W BERG LYONS D LOZUPONE, C TURNBAUCH, P FIERER, N & KNIGHT, R 2011 Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample *PNAS 108*(1) 4516 4522

CARRINGTON, L B, ARMIJOS M V LAMBRECHTS L BARKER C M & SCOTT, T W 2013 Effects of fluctuating daily temperatures at critical thermal extremes on Aedes aegypti life history traits *PloS one* 8(3) e58824

CHAN, K L HO B C & CHAN, Y C 1971 *Aedes aegypti* (L) and *Aedes albopictus* (Skuse) in Singapore city 2 Larval habitats *Bulletin of the World Health Organization* 44(5) 629 633

CHAOUIN CARNEIRO T VEGA RUA, A , VAZEILLE M YEBAKIMA A GIROD, R , GOINDIN, D & FAILLOUX A B 2016 Differential Susceptibilities of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* from the Americas to Zika Virus *PLoS neglected tropical diseases* *10*(3) e0004543

CLARK T M FLIS B J & REMOLD S K 2004 pH tolerances and regulatory abilities of freshwater and euryhaline Aedine mosquito larvae *Journal of Experimental Biology* *207*(13) 2297 2304

COON K L BROWN M R & STRAND, M R 2016 Mosquitoes host communities of bacteria that are essential for development but vary greatly between local habitats *Molecular ecology* *25*(22) 5806 5826

COSTANZO K S KESAVARAJU B & JULIANO S A 2005 Condition specific competition in container mosquitoes The role of noncompeting life history stages *Ecology* *86*(12) 3289 3295

DAVID M R LOURENÇO DE OLIVEIRA R & FREITAS, R M D 2009 Container productivity daily survival rates and dispersal of *Aedes aegypti* mosquitoes in a high income dengue epidemic neighbourhood of Rio de Janeiro presumed influence of differential urban structure on mosquito biology *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* *104*(6) 927 932

DE O GAIO A GUSMÃO D S SANTOS A V , BERBERT MOLINA M A , PIMENTA P F & LEMOS, F J 2011 Contribution of midgut bacteria to blood digestion and egg production in *Aedes aegypti* (Diptera Culicidae)(L) *Parasites & vectors* *4*(1) 105

DELATTE H CIMONNEAU, G TRIBOIRE A , & FONTENILLE D 2009 Influence of temperature on immature development survival longevity fecundity and gonotrophic cycles of Aedes albopictus vector of chikungunya and dengue in the Indian Ocean *Journal of medical entomology* *46*(1) 33 41

DELATTE H, DESVARS A BOUETARD, A BORD S GIMONNEAU G VOURC H, G & FONTENILLE, D 2010 Blood feeding behavior of Aedes albopictus a vector of Chikungunya on La Reunion *Vector Borne and Zoonotic Diseases* *10*(3) 249 258

DOTRO P NARDI M, RODRIGUEZ D & RODRIGUEZ, V 1994 Estudio de la evolucion del pH en funcion de la temperatura *EMEI* 4(18) 1 65

DOUGLAS A E 1998 Nutritional interactions in insect microbial symbioses aphids and their symbiotic bacteria *Buchnera* *Annual review of entomology* *43*(1) 17 37

DUGUMA D RUGMAN JONES P KAUFMAN, M G, HALL, M W, NEUFELD J D, STOUTHAMER R & WALTON W F 2013 Bacterial communities associated with *Culex* mosquito larvae and two emergent aquatic plants of bioremediation importance *PLoS One* *8*(8) e72522

DUTRA H L C ROCHA, M N DIAS, F B S MANSUR S B CARAGATA, E P & MOREIRA L A 2016 *Wolbachia* blocks currently circulating Zika virus isolates in Brazilian *Aedes aegypti* mosquitoes *Cell host & microbe* *19*(6) 771 774

EGIZI A, KISER J ABADAM C & FONSECA D M 2016 The hitchhiker s guide to becoming invasive exotic mosquitoes spread across a US state by human transport not autonomous flight *Molecular ecology* *25*(15) 3655 3047

EWING D A, COBBOLD C A PURSE B V NUNN M A & WHITE S M 2016 Modelling the effect of temperature on the seasonal population dynamics of temperate mosquitoes *Journal of theoretical biology* *400* 65 79

FARIKOU O NJIOKOU F MBIDA, J A M NJITCHOUANG, G R DJEUNGA, H N, ASONGANYI T & GEIGER, A 2010 Triparite interactions between tsetse flies Sodalis glossinidius and trypanosomes—an epidemiological approach in two historical human African trypanosomiasis foci in Cameroon *Infection Genetics and Evolution* *10*(1) 115 121

CETACHEW D TFKIE H, GEBRE MICHAEL T BALKEW M & MESFIN, A 2015 Breeding sites of *Aedes aegypti* potential dengue vectors in Dire Dawa East Ethiopia *Interdisciplinary perspectives on infectious diseases* 2015 706276

GIMONNEAU G TCHIOFFO M T, ABATE L BOISSIERE A AWONO AMBENE P H NSANGO, S E, & MORLAIS, I 2014 Composition of *Anopheles coluzzii* and *Anopheles gambiae* microbiota from larval to adult stages *Infection Genetics and Evolution 28* 715 724

GOH K T, NG, S K & KUMARAPATHY S 1985 Disease bearing insects brought in by international aircraft into Singapore *The Southeast Asian journal of tropical medicine and public health 16*(1) 49 53

GONZALEZ J M BROWN B J & CARLTON B C 1982 Transfer of *Bacillus thuringiensis* plasmids coding for delta endotoxin among strains of B thuringiensis and B cereus *Proceedings of the National Academy of Sciences 79*(22) 6951 6955

GRIFFITH, D VEECH, J & MARSH, C 2016 *Cooccur probabilistic species co occurrence analysis in R* Journal of Statistical Software *69*(2) 1 17

GUAY J F BOUDREAULT S MICHAUD, D & CLOUTIER C 2009 Impact of environmental stress on aphid clonal resistance to parasitoids role of Hamiltonella defensa bacterial symbiosis in association with a new facultative symbiont of the pea aphid *Journal of Insect Physiology 55*(10) 919 926

GUBLER D J 1971 Studies on the comparative oviposition behavior of *Aedes* (Stegomyia) *albopictus* and *Aedes* (Stegomyia) *polynesiensis* Marks *Journal of medical entomology 8*(6) 675 682

GURUPRASAD N M JALALI S K, & PUTTARAJU, H P 2014 *Wolbachia* a foe for mosquitoes *Asian Pacific journal of tropical disease 4*(1) 78 81

HAMMER Ø HARPER D A T, RYAN P D 2001 PAST Paleontological statistics software package for education and data analysis *Palaeontologia Electronica 4*(1) 9pp

HAROLD, C H H 1926 Studies on Mosquito Bionomics *Journal of the Royal Army Medical Corps 47*(3) 180 187

HARRINGTON, L C SCOTT, T W LERDTHUSNEE, K, COLEMAN R C COSTERO, A, CLARK, G C, & EDMAN J D 2005 Dispersal of the dengue vector *Aedes aegypti* within and between rural communities *The American journal of tropical medicine and hygiene 72*(2) 209 220

HAUSERMANN W FAY R W, & HACKER, C S 1971 Dispersal of genetically marked female *Aedes aegypti* in Mississippi *Mosquito News 31*(1) 37 51

HEADLEE, T J 1942 A Continuation of the Studies of the relative Effects on Insect Metabolism of Temperature derived from constant and varied Sources *Journal of Economic Entomology 35*(5) 785 786

HOFFMANN, A A MONTGOMERY B L POPOVICI, J, ITURBE OR MAETXE, I, JOHNSON, P H, MUZZI F & COOK, H 2011 Successful establishment of *Wolbachia* in *Aedes* populations to suppress dengue transmission *Nature 476*(7361) 454 457

HOFFMANN, A A ITURBE ORMAETXE I CALLAHAN A G PHILLIPS B L, BILLINGTON K AXFORD J K, & O NEILL, S L 2014 Stability of the wMel *Wolbachia* infection following invasion into *Aedes aegypti* populations *PLoS neglected tropical diseases 8*(9) e3115

HONORIO N A SILVA W D C, LEITE P J GONÇALVES J M LOUNIBOS L P, & LOURENCO 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

HUFFAKER C B 1944 The Temperature Relations Of The Immature Stages Of The Malarial Mosquito *Anopheles Quadrimaculatus* Say With A Comparison Of The Developmental Power Of Constant And Variable Temperatures In Insect Metabolism 1 2 *Annals of the Entomological Society of America 37*(1) 1 27

HUMAN MICROBIOME PROJECT CONSORTIUM 2012 Structure function and diversity of the healthy human microbiome *nature 486*(7402) 207 214

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

JOYCE, C R & NAKAGAWA P Y 1963 *Aedes vexans nocturnus* (Theobald) in Hawaii *Proceedings Hawaiian Entomological Society 18(2)* 273 280

JULIANO, S A 1998 Species introduction and replacement among mosquitoes interspecific resource competition or apparent competition? *Ecology 79*(1) 255 268

JULIANO S A & PHILIP LOUNIBOS L 2005 Ecology of invasive mosquitoes effects on resident species and on human health *Ecology letters 8*(5) 558 574

KAUFMAN, M G WALKER E D SMITH T W MERRITT, R W & KLUG, M J 1999 Effects of larval mosquitoes (Aedes triseriatus) and stemflow on microbial community dynamics in container habitats *Applied and environmental microbiology 65*(6) 2661 2673

KRAEMER M U SINKA M E DUDA K A MYLNE, A Q , SHEARER F M BARKER, C M & HENDRICKX C 2015 The global distribution of the arbovirus vectors *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus Elife 4* e08347

KRAMER S D 1915 The effect of temperature on the life cycle of *Musca domestica* and *Culex pipiens* *Science* *41*(1067) 874 877

LACROIX R, DELATTE H HUE T & REITER, P 2009 Dispersal and survival of male and female *Aedes albopictus* (Diptera Culicidae) on Reunion Island *Journal of medical entomology* *46*(5) 1117 1124

LEY, R E HAMADY M, LOZUPONE, C TURNBAUGH, P J RAMEY R R, BIRCHER J S & GORDON, J I 2008 Evolution of mammals and their gut microbes *Science* *320*(5883) 1647 1651

LIEW C C F C & CURTIS, C F 2004 Horizontal and vertical dispersal of dengue vector mosquitoes *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in Singapore *Medical and veterinary entomology* *18*(4) 351 360

LINDSTROM E S 2000 Bacterioplankton community composition in five lakes differing in trophic status and humic content *Microbial Ecology* *40*(2) 104 113

LYIMO, E O TAKKEN, W, & KOELLA J C 1992 Effect of rearing temperature and larval density on larval survival size at pupation and adult size of *Anopheles gambiae* *Entomologia experimentalis et applicata* *63*(3) 265 271

MACGREGOR M E 1929 The significance of the pH in the development of mosquito larvae *Parasitology* *21*(1 2) 132 157

MACIEL DE FREITAS, R, & LOURENÇO DE OLIVEIRA R 2009 Presumed unconstrained dispersal of *Aedes aegypti* in the city of Rio de Janeiro Brazil *Revista de Saude Publica* *43*(1) 8 12

MACIEL DE FREITAS, R, SOUZA SANTOS R CODEÇO C T, & LOURENÇO DE OLIVEIRA, R 2010 Influence of the spatial distribution of human hosts and large size containers on the dispersal of the mosquito *Aedes aegypti* within the first gonotrophic cycle *Medical and veterinary entomology* *24*(1) 74 82

MARINI, F CAPUTO B POMBI M, TARSITANI G & DELLA TORRE, A 2010 Study of *Aedes albopictus* dispersal in Rome Italy using sticky traps in mark–release–recapture experiments *Medical and veterinary entomology 24*(4) 361 368

MAZEROLLE M J 2017 AICcmodavg Model selection and multimodel inference based on (Q)AIC(c) R package version 2 1 1 https://cran r project org/package=AICcmodavg

MARINHO R A BESERRA F B, BEZERRA GUSMAO M A, PORTO V D S OLINDA R A & DOS SANTOS C A 2016 Effects of temperature on the life cycle expansion and dispersion of *Aedes aegypti* (Diptera Culicidae) in three cities in Paraiba Brazil *Journal of Vector Ecology 41*(1) 1 10

MCHUGH C P, & OLSON J K 1982 The effect of temperature on the development growth and survival of *Psorophora columbiae MOSQ NEWS 42*(4) 608 613

MCMENIMAN, C J LANE R V CASS B N, FONG A W, SIDHU, M WANG Y F, & O NEILL S L 2009 Stable introduction of a life shortening *Wolbachia* infection into the mosquito *Aedes aegypti Science 323*(5910) 141 144

MEDEIROS M C BOOTHE E C ROARK E B & HAMER G L 2017 Dispersal of male and female *Culex quinquefasciatus* and *Aedes albopictus* mosquitoes using stable isotope enrichment *PLoS neglected tropical diseases 11*(1) e0005347

MEDLEY, K A JENKINS D C & HOFFMANN E A 2015 Human aided and natural dispersal drive gene flow across the range of an invasive mosquito *Molecular ecology 24*(2) 284 295

MEDLOCK, J M, VAUX A G CULL, B SCHAFFNER F GILLINGHAM, E PFLUGER, V, & LEACH S 2017 Detection of the invasive mosquito species *Aedes albopictus* in southern England *The Lancet Infectious Diseases 17*(2) 140

MERRITT R W DADD R H & WALKER E D 1992 Feeding behavior natural food and nutritional relationships of larval mosquitoes *Annual review of entomology* *37*(1) 349 374

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

MOORE, C G & MITCHELL C J 1997 *Aedes albopictus* in the United States ten year presence and public health implications *Emerging infectious diseases* *3*(3) 329 334

MOREIRA L A ITURBE ORMAETXE, I, JEFFERY J A LU G, PYKE A T, HEDGES L M, & HUGO L E 2009 A *Wolbachia* symbiont in *Aedes aegypti* limits infection with dengue Chikungunya and Plasmodium *Cell* *139*(7) 1268 1278

MUTURI E J, RAMIREZ J L ROONEY A P & KIM C H 2017 Comparative analysis of gut microbiota of mosquito communities in central Illinois *PLoS neglected tropical diseases* *11*(2) e0005377

O MEARA G F EVANS JR L F, GETTMAN A D & CUDA J P 1995 Spread of *Aedes albopictus* and decline of *Aedes aegypti* (Diptera Culicidae) in Florida *Journal of Medical Entomology* *32*(4) 554 562

PAN X PIKE A JOSHI D BIAN C MCFADDEN M J LU P & XI Z 2017 The bacterium *Wolbachia* exploits host innate immunity to establish a symbiotic relationship with the dengue vector mosquito *Aedes aegypti* *The ISME Journal* *3* 1 12

PATIL, C D, PATIL, S V SALUNKE B K, & SALUNKHE R B 2011 Prodigiosin produced by *Serratia marcescens* NMCC46 is a mosquito larvicidal agent

against *Aedes aegypti* and *Anopheles stephensi* *Parasitology research* 109(4) 1179 1187

PENN G H 1947 The larval development and ecology of *Aedes* (Stegomyia) *scutellaris* (Walker 1859) in New Guinea *The Journal of parasitology* *33*(1) 43 50

PIPPIN W F, THOMPSON, S, & WILSON R 1968 The interception of living larvae of *Aedes aegypti* (L) and *Culex cinereus* Ldw in aircraft *Mosquito News* *28*(4)

PONLAWAT A & HARRINGTON, L C 2005 Blood feeding patterns of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in Thailand *Journal of medical entomology* *42*(5) 844 849

PONNUSAMY, L, XU N STAV, G WESSON D M SCHAL, C & APPERSON C S 2008 Diversity of bacterial communities in container habitats of mosquitoes *Microbial ecology* *56*(4) 593 603

POWELL, J R, & TABACHNICK W J 2013 History of domestication and spread of *Aedes aegypti* A Review *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* *108* 11 17

PRATT J J R H HETRICK, J B HARRISON AND L HABER 1946 Flies as a factor in the transportation of mosquitoes by ship *Mil Surgeon* 99 785D788

PREECHAPORN W JAROENSUTASINEE, M & JAROENSUTASINEE K 2006 The Larval Ecology of *Aedes aegypti* and *Ae albopictus* in Three Topographical Areas of Southern Thailand 30 204 213

R CORE TEAM 2017 R A language and environment for statistical computing R Foundation for Statistical Computing Vienna Austria URL https://www.R-project.org/

RAMOS R E H D C & ARANDAI E C 2000 Aircraft mediated mosquito transport New direct evidence *Journal of the American Mosquito Control Association 16*(4) 339 343

REITER P & SPRENGER, D 1987 The used tire trade a mechanism for the world wide dispersal of container breeding mosquitoes *Journal of the American Mosquito Control Association 3*(3) 494 501

REITER, P AMADOR M A, ANDERSON R A & CLARK G G 1995 Dispersal of *Aedes aegypti* in an urban area after blood feeding as demonstrated by rubidium marked eggs *The American journal of tropical medicine and hygiene 52*(2) 177 179

REITER P A U L 1998 *Aedes albopictus* and the world trade in used tires 1988 1995 the shape of things to come? *Journal of the American Mosquito Control Association 14*(1) 83 94

RICHARDSON L A 2017 Evolving as a holobiont *PLoS biology 15*(2) e2002168

ROSSI G C, & ALMIRON W R 2004 Clave ilustrada para la identificacion de larvas de mosquitos de interes sanitario encontradas en criaderos artificiales en la Argentina *Buenos Aires Fundacion Mundo Sano* 1 49

RUEDA L M PATEL K J AXTELL R C & STINNER, R E 1990 Temperature dependent development and survival rates of *Culex quinquefasciatus* and *Aedes aegypti* (Diptera Culicidae) *Journal of medical entomology 27*(5) 892 898

RUEDA L M 2004 Pictorial keys for the identification of mosquitoes (Diptera Culicidae) associated with dengue virus transmission *Walter Reed Army Inst Of Research Washington Dc Department Of Entomology* 589 1 60

RUSSELL, P F & RAO, T R 1942 On the ecology of larvae of *Anopheles culicifacies* Giles in borrow pits *Bulletin of Entomological Research 32*(4) 341 361

RUSSELL R C 1987 Survival of insects in the wheel bays of a Boeing 747B aircraft on flights between tropical and temperate airports *Bulletin of the World Health Organization 65*(5) 659 662

SALIT A M, AL TUBIAKH S S EL FIKI S A, ENAN O H & WILDEY K 1996 Physical and chemical properties of different types of mosquito aquatic breeding places in Kuwait State In *Proceedings of the Second International Conference on Urban Pests ICUP Edinburgh UK* 185 193

SCHOLTE, E J IBAÑEZ JUSTICIA A STROO A, DE ZEEUW J DEN HARTOG W & REUSKEN, C 2014 Mosquito collections on incoming intercontinental flights at Schiphol International airport The Netherlands 2010–2011 *J Eur Mosq Control Assoc 32* 17 21

SCOTT T W, CLARK G G LORENZ L H AMERASINGHE, P H, REITER P & EDMAN, J D 1993 Detection of multiple blood feeding in *Aedes aegypti* (Diptera Culicidae) during a single gonotrophic cycle using a histologic technique *Journal of Medical Entomology 30*(1) 94 99

SENIOR WHITE, R 1925 Physical factors in mosquito ecology *Bulletin of Entomological Research 16*(3) 187 248

SERVICE, M W 1997 Mosquito (Diptera Culicidae) dispersal—the long and short of it *Journal of medical entomology 34*(6) 579 588

SHELTON R M 1973 The effect of temperatures on development of eight mosquito species *Mosq News 33*(1) 1 12

SOTA T & MOGI M 1992 Interspecific variation in desiccation survival time of *Aedes* (Stegomyia) mosquito eggs is correlated with habitat and egg size *Oecologia 90*(3) 353 358

SPRENGFR D AND T WUITHIRANYAGOOL 1986 The discovery and distribution of *Aedes albopictus* in Harris County Texas J Am Mosq Control Assoc 2 217 2r9

TABACHNICK W J 1991 Evolutionary genetics and arthropod borne disease the yellow fever mosquito *American Entomologist 37*(1) 14 26

TRPIS M 1972 Development and predatory behavior of *Toxorhynchites brevipalpis* (Diptera Culicidae) in relation to temperature *Environmental Entomology 1*(5) 537 546

TSUDA Y & TAKAGI, M 1994 Ecological study on mosquito communities in tree holes in Nagasaki Japan with special reference to *Aedes albopictus* (Diptera Culicidae) *Medical Entomology and Zoology 45*(2) 103 111

TSUDA, Y & TAKAGI M 2001 Survival and development of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera Culicidae) larvae under a seasonally changing environment in Nagasaki Japan *Environmental Entomology 30*(5) 855 860

TUN LIN, W BURKOT T R & KAY B H 2000 Effects of temperature and larval diet on development rates and survival of the dengue vector *Aedes aegypti* in north Queensland Australia *Medical and veterinary entomology 14*(1) 31 37

URIBE, L J 1983 El problema del control de *Aedes aegypti* en America *Boletin de la Oficina Sanitaria Panamericana 94*(5) 475 481

VERDONSCHOT, P F & BESSE LOTOTSKAYA, A A 2014 Flight distance of mosquitoes (Culicidae) a metadata analysis to support the management of buffer zones around rewetted and newly constructed wetlands *Limnologica Ecology and Management of Inland Waters 45* 69 79

VOGEL, U , LUHKEN R & KIEL E 2014 A Tool for Simulating the Spread of Invasive Mosquitoes In *EnviroInfo* 279 286

WALKER, T J P H, JOHNSON, P H MORFIRA L A ITURBE OR MAETXE I FRENTIU, F D MCMENIMAN C J & LLOYD A L 2011 The wMel *Wolbachia* strain blocks dengue and invades caged *Aedes aegypti* populations *Nature 476* (7361) 450 453

WALKER, E D 2016 Toxicity of Sulfide and Ammonium to *Aedes triseriatus* Larvae (Diptera Culicidae) in Water Filled Tree Holes and Tires *Journal of medical entomology 53*(3) 577 583

WANG, Y GILBREATH III, T M KUKUTLA P YAN G & XU, J 2011 Dynamic gut microbiome across life history of the malaria mosquito *Anopheles gambiae* in Kenya *PloS one 6*(9) e24767

WERREN J H, BALDO, L & CLARK M E 2008 *Wolbachia* master manipulators of invertebrate biology *Nature Reviews Microbiology 6*(10) 741 751

YEE D A 2008 Tires as habitats for mosquitoes a review of studies within the eastern United States *Journal of Medical Entomology 45*(4) 581 593

YEE D A 2016 Thirty years of *Aedes albopictus* (Diptera Culicidae) in America An introduction to current perspectives and future challenges *Journal of medical entomology 53*(5) 989 991

XI Z KHOO, C C, & DOBSON S L 2005 *Wolbachia* establishment and invasion in an *Aedes aegypti* laboratory population *Science 310*(5746) 326 328

ANEXO I FIGURAS

Figura S1. Algunos ejemplos de recipientes donde *Aedes aegypti* y/o *Aedes albopictus* fueron encontrados.

A: Cajón plástico de frigorífico; B: Bidón para acumular agua; C: Pote de cerámica; D: Pieza plástica de vehículo; E: Hueco en árbol cortado; F: Llanta cortada utilizada como bebedero para animales domésticos; G: Letrina de cerámica; H: Llanta usada; I: Lona plástica; J: Congelador abandonado.

Figura S2. Muestra de viviendas familiares visitadas durante los años 2016 y 2017

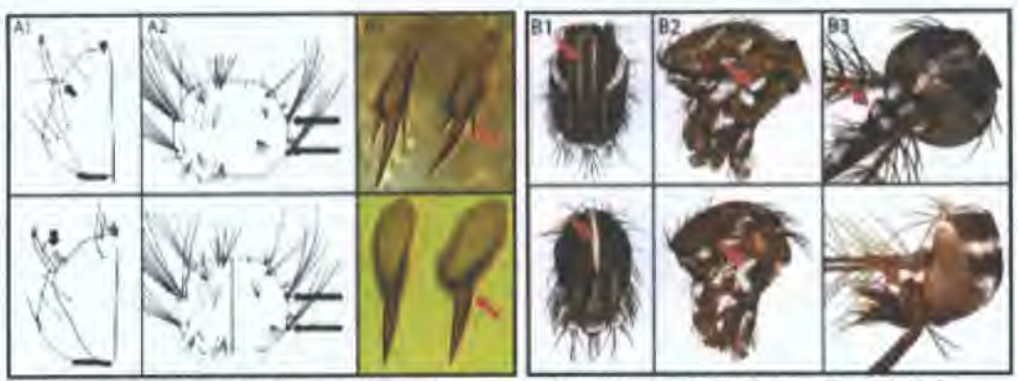
Figura S3. Muestra de los talleres visitados durante los años 2016 y 2017

Figura S4. Metodología de recolecta y manejo de muestras

A: Recolecta en sitios de cría junto a personal del Ministerio de Salud; B: Georreferenciación y toma de datos físico-químicos; C: Muestras recolectadas en bolsas Whirl-Pak; D: Ovitrampa utilizado en talleres; E: Cámaras de cría.

Figura S5. Caracteres para la identificación taxonómica de larvas y adultos de

Aedes aegypti* y *Aedes albopictus



Aedes aegypti *(Arriba)* y Aedes albopictus *(Abajo) en larvas (Cuadro A), y adultos (Cuadro B). A1: Seta cefálica VII; A2: Espinas torácicas; A3: Morfología de los dientes del peine ventral. B1: Patrón de líneas longitudinales en el notum; B2: Mancha pleural en forma de coma; B3: Escamas blancas en el clípeus.*

Figura S6 Histogramas de distribucion de las medidas de Temperatura y pH de los sitios de cria

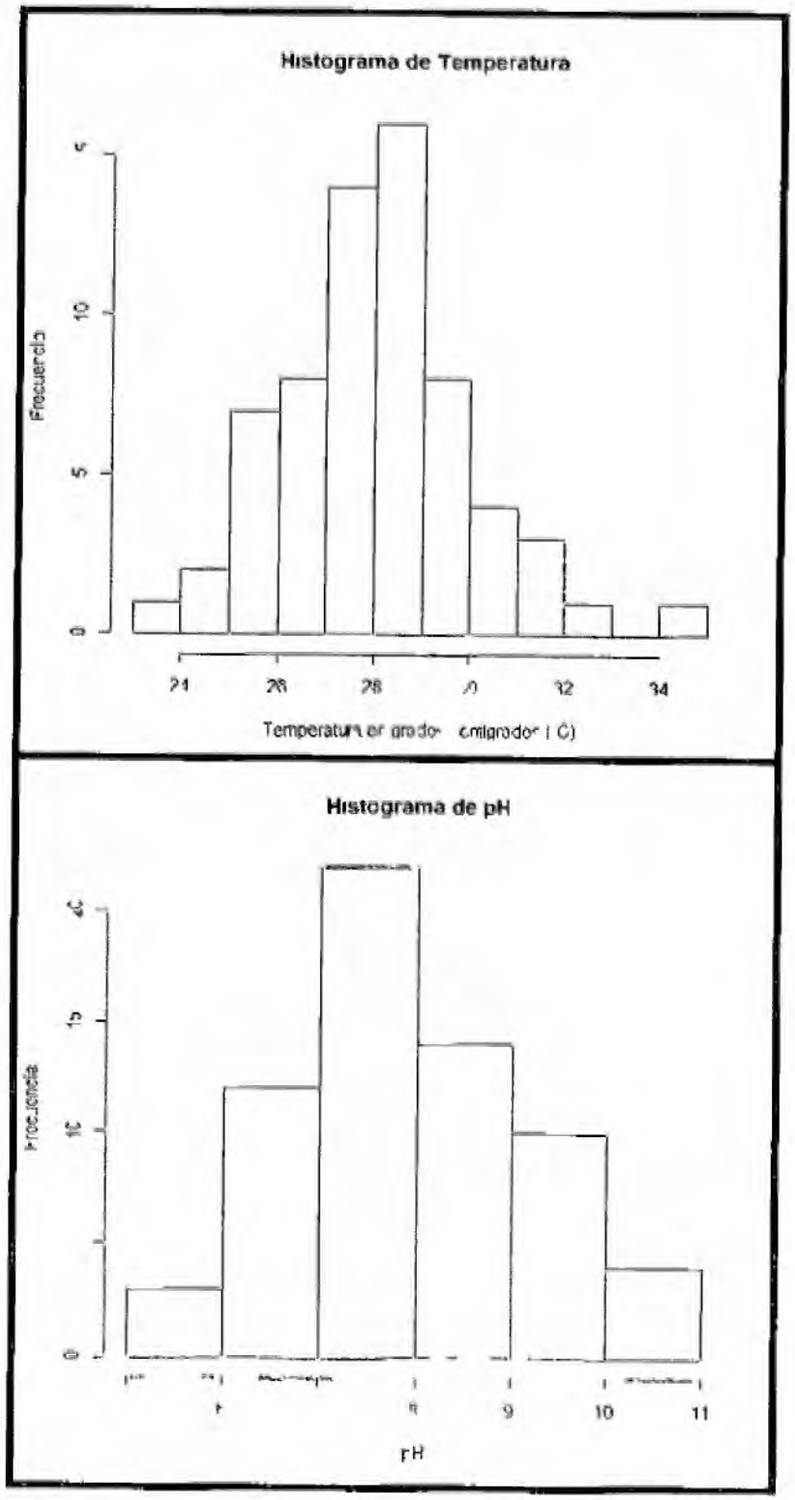


Figura S7 Grafica de correlacion de Temperatura y pH

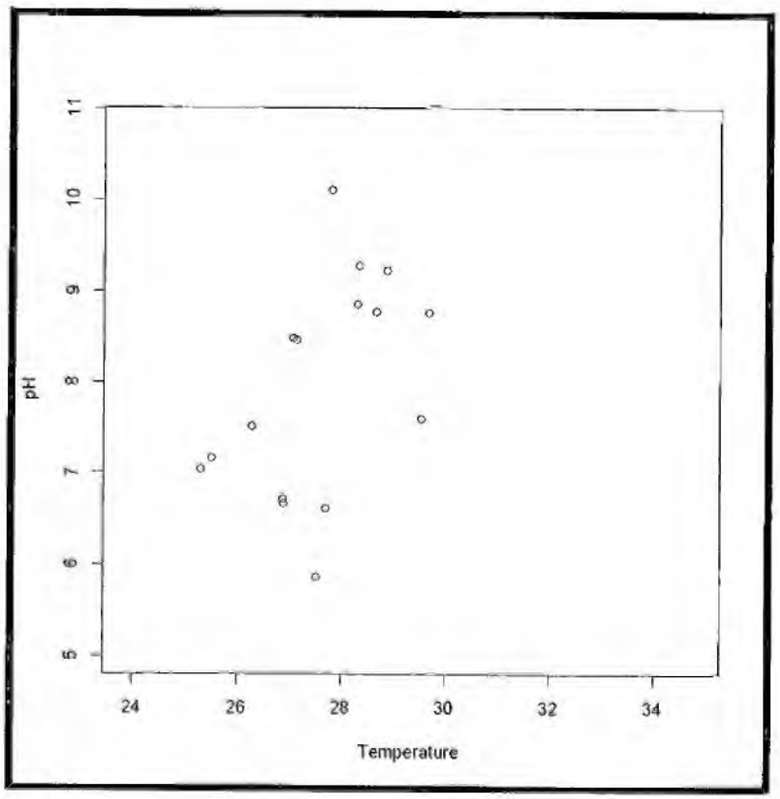
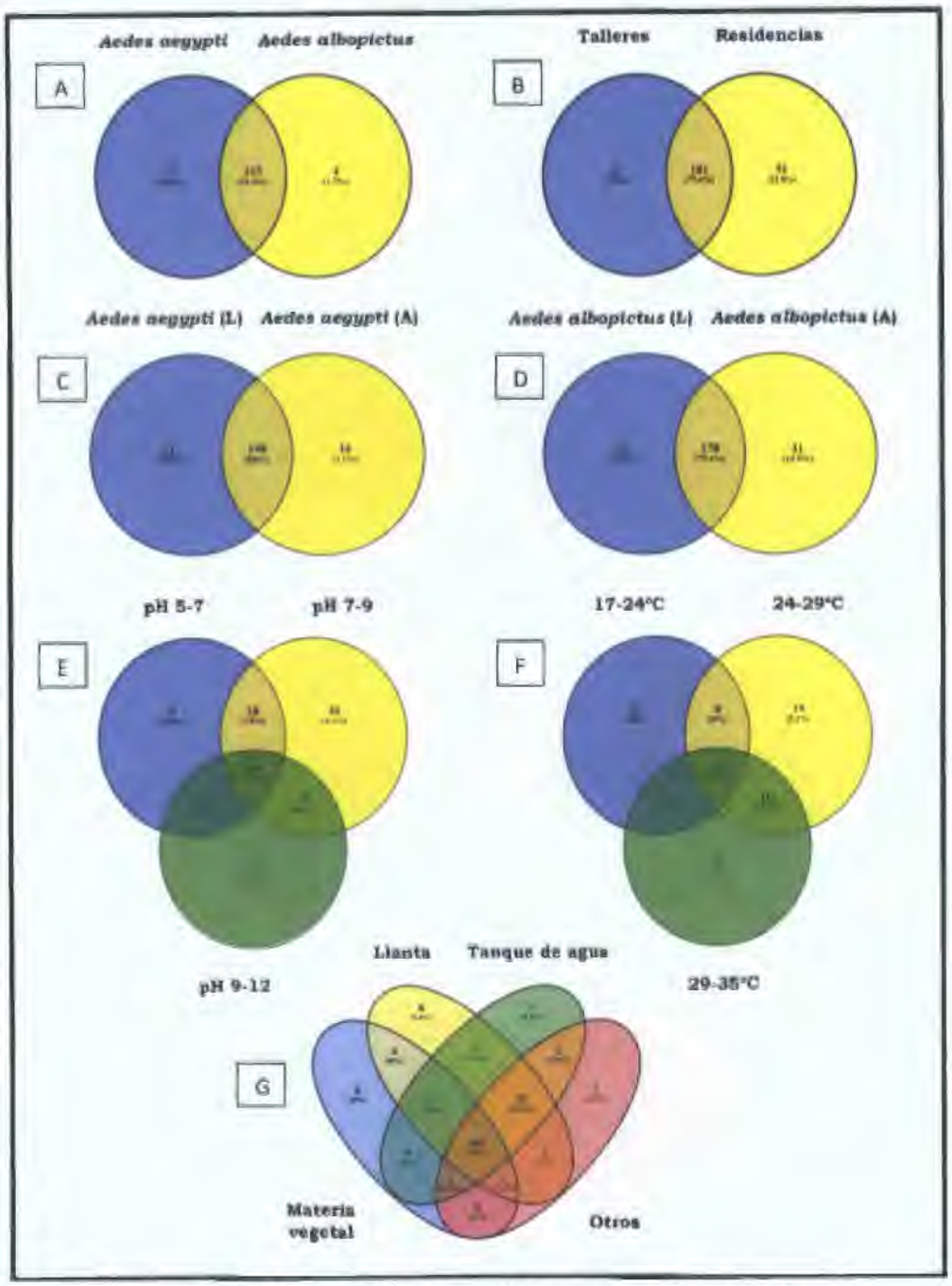


Figura S8. Distribución de las OTUs encontradas en distintas categorías



A) Especies; B) Lugar de Recolecta; C) y D) Estadio; E) pH F) Temperatura; G) Tipo de sitio de cría

Figura S9. Diversidad de Phyla microbianos encontrados en *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus*

Figura S10. Postura de huevos del género *Aedes* encontrada en ovitrampa

ANEXO II CUADROS

Cuadro S1 Rangos de tolerancia y temperatura optima (C) de desarrollo de distintas especies de Culicidae de acuerdo a la literatura

Especie	Rango de T estudiado	T optima de desarrollo	T Limite inferior	T Limite superior	Referencias
Aedes aegypti	14 38	30	14	36	Bai Zeev 1958
	10 40	35	na	40	Tun Lin *et al* 2000
	na	na	8 5	na	Tsuda & Takagi 2001
	16 39	22 32	na	39	Marinho *et al* 2016
Ae albopictus	na	na	5 3	na	Tsuda & Takagi 2001
	5 40	29 7	10 4	40	Delatte *et al* 2009
Ae nigromaculis	21 32	21 26 5	11	35	Brust 1967
Ae sollicitans	12 35	30	12	na	Shelton 1973
Ae sticticus	5 34	na	6	33	Trips et al 1973
Ae trisenatus	12 35	26	na	35	Shelton 1973
Ae vexans	21 32	26 5 32	9	38	Brust 1967
Anopheles albimanus	12 35	26	15	35	Shelton 1973
An gambiae	24 30	27	na	na	Lyimo et al 1992
	10 40	30 32	18	34	Bayoh & Lindsay 2003
An quadrimaculatus	10 35	31	7	35	Huffaker 1944
	12 35	24	15	32	Shelton 1973
Culex pipiens	20 40	30	na	35	Kramer 1915
Cx quinquefasciatus	12 35	23 26	na	35	Shelton 1973
	15 34	20 27	na	na	Rueda et al 1990
Cx restuans	12 35	29	na	32	Shelton 1973
Cx salinarus	12 35	23	na	35	Shelton 1973
Culiseta inornata	21 32	20 22	6	29	Brust 1967
	12 35	26	12	29	Shelton 1973
Psorophora columbiae	16 39	28 34	na	39	McHugh & Olson 1982
Toxorhynchites brevipalpis	14 32	29 30	13	33	Trips 1972

Cuadro S2 Literatura sobre el estudio del efecto del pH en distintas especies de Culicidae

Especie	Referencias
Aedes aegypti	MacGregor 1929
	Buddington 1940
	Clark 2004
	Bhami et al 2015
	Bazo et al 2017
Aedes albopictus	Senior White 1925
	Gubler 1971
	Bhami et al 2015
	Bazo et al 2017
Aedes caspius	Salit et al 1996
Aedes polynesiensis	Gubler 1971
Aedes scutellaris	Penn 1947
Aedes taeniorhynchus	Clark 2004
Anopheles crucians	Barber & Komp 1922
Anopheles culicifacies	Russell & Ramachandra 1942
Anopheles maculipennis	Beklemishev & Mitrofanova 1926
Anopheles punctipennis	Barber & Komp 1922
Anopheles quadrimaculatus	Barber & Komp 1922
Anopheles spp	Salit et al 1996
Culex pipiens	Buddington 1940
	Salit et al 1996
Culex pusillus	Salit et al 1996
Culex quinquefasciatus	Bazo et al 2017
Culex restuans	Bazo et al 2017
Culiseta spp	Salit et al 1996

Cuadro S3 Sitios de cría hallados en residencias de localidades de Panamá durante 2016 y 2017

BT Bocas del Toro; CH Chiriquí; CL Coclé; CN Colón; DA Darién; LS Los Santos; PA Panamá; VE Veraguas

Provincia	Localidad	Material	Latitud	Longitud	T	pH	Año	Ae. aegypti	Ae. albopictus
BT	Almirante	plastic	9.291275	82.401916	30.83	7.04	2017	1	0
BT	Almirante	plastic	9.291275	82.401916	29.77	7.25	2017	1	0
BT	Changuinola	ceramic	9.450213	82.523755	28.37	7.03	2017	1	0
BT	Changuinola	rubber	9.450990	82.524320	29.60	9.26	2016	1	0
BT	Changuinola	rubber	9.450990	82.524320	28.87	9.34	2016	1	0
BT	Changuinola	organic	9.454055	82.516475	29.37	6.83	2017	1	0
BT	Changuinola	rubber	9.476051	82.507743	26.33	7.43	2017	1	0
BT	Changuinola	rubber	9.476081	82.507743	25.87	7.63	2017	1	0
BT	Changuinola	rubber	9.477573	82.506068	26.97	7.71	2017	1	0
BT	Changuinola	metal	9.477641	82.510542	25.93	7.55	2017	1	0
BT	Chiriquí Grande	rubber	8.943543	82.11308	30.63	6.95	2017	1	0
BT	Chiriquí Grande	glass fiber	8.944469	82.114122	29.73	7.25	2017	1	0
BT	Chiriquí Grande	plastic	8.944469	82.114122	30.43	7.46	2017	1	0
BT	Chiriquí Grande	plastic	8.951492	82.120056	30.33	7.01	2017	1	0
BT	Chiriquí Grande	rubber	8.944450	82.114100	26.10	9.43	2016	1	0
BT	Chiriquí Grande	metal	8.940290	82.118960	28.33	9.28	2016	1	0
BT	Chiriquí Grande	plastic	8.946290	82.118960	30.10	9.32	2016	1	0
BT	Isla Colón	rubber	9.339490	82.243110	27.07	8.49	2016	1	0
BT	Isla Colón	plastic	9.341730	82.242850	27.13	8.47	2016	1	0
BT	Isla Colón	plastic	9.344080	82.251680	25.73	9.31	2016	1	0
BT	Isla Colón	plastic	9.344660	82.251820	25.47	8.93	2016	1	0
BT	Isla Colón	plastic	9.346360	82.253110	25.27	9.41	2016	1	0
BT	Isla Colón	rubber	9.357820	82.252900	27.13	8.12	2016	1	0
BT	Isla Colón	rubber	9.362620	82.239050	26.27	8.17	2016	1	0
CH	David	plastic	8.415737	82.427232	33.27	8.57	2017	0	1
CH	David	rubber	8.421805	82.425909	25.20	10.43	2016	1	0
CH	Caldera	N/A	8.525675	82.298607	31.37	7.70	2017	0	1
CH	Gualaca	tarp	8.526749	82.298073	29.53	7.83	2017	0	1
CH	Gualaca	plastic	8.528255	82.297362	29.50	8.15	2017	0	1
CH	Gualaca	plastic	8.528276	82.297427	27.50	8.01	2017	0	1
CH	Gualaca	rubber	8.528701	82.297844	27.23	10.16	2016	0	1
CH	Gualaca	organic	8.533181	82.297747	NaN	NaN	2017	0	1
CH	Gualaca	plastic	8.536745	82.298271	27.00	7.54	2017	0	1
CL	El Copé	rubber	8.610040	80.582340	24.97	8.18	2016	0	1
CN	Portobelo	rubber	9.553460	79.648020	28.10	8.67	2016	1	0
CN	Portobelo	metal	9.553460	79.648020	27.87	8.76	2016	0	1
CN	Portobelo	tarp	9.554440	79.653000	26.40	8.09	2016	1	0

Prov nc a	Local dad	M t r al	L t tud	I ong tud	T	pH	Ano	Ae egypt	A albop ctus
CN	Sab tas	l bc	9 350910	79 796020	28 87	9 23	2017	1	0
CN	Sabanitas	ul b	9 350930	79 796060	28 17	8 78	2017	1	0
DA	M tet	plast c	8 491371	77 982617	28 70	10 27	2017	1	1
DA	Metet	pla tic	8 495039	77 981407	28 40	10 37	2017	1	1
DA	Metet	rul ber	8 495840	77 982696	NaN	NaN	2017	1	1
DA	Metet	rul ber	8 499740	77 976960	30 03	10 56	2017	1	1
DA	Meteti	plastic	8 512656	77 978220	26 07	12 03	2017	0	1
LS	Cacao	rubber	7 448333	80 406388	NaN	NaN	2017	0	1
LS	El Cacao	plast c	7 447889	80 404333	29 57	5 51	2016	0	1
LS	El Cacao	tarp	7 448389	80 403600	32 63	7 40	2016	0	1
LS	El Cacao	rubb r	7 448389	80 403600	28 80	7 57	2016	0	1
LS	El Cacao	plast c	7 448639	80 406194	27 73	7 09	2016	0	1
LS	El Cacao	r l ber	7 448703	80 406194	29 27	7 57	2016	0	1
LS	El Cacao	tarp	7 448722	80 406222	28 00	7 01	2016	0	1
LS	El Cacao	ta p	7 448778	80 406194	28 97	7 21	2016	0	1
LS	La Villa	tarp	7 931556	80 409944	29 63	7 40	2016	1	1
LS	La Villa	plast c	7 931666	80 417500	NaN	NaN	2017	1	0
LS	La Villa	plast c	7 932361	80 419250	28 17	6 65	2016	1	1
LS	La V lla	plast c	7 932806	80 415111	30 23	6 69	2016	1	0
LS	La V lla	plastic	7 932917	80 415056	29 53	7 60	2016	1	0
LS	La V lla	plastic	7 935639	80 422167	26 90	6 67	2016	1	1
LS	La V lla	plastic	7 935639	80 422167	28 43	6 87	2016	1	0
LS	La Villa	plast c	7 936361	80 415778	26 87	6 72	2016	1	0
LS	La V lla	plast c	7 941444	80 411139	27 10	6 46	2016	1	1
LS	Macaracas	orga ic	7 727460	80 551900	27 53	5 87	2016	0	1
LS	Mac racas	c ram c	7 729083	80 551472	27 43	7 87	2016	0	1
LS	Macaracas	plast c	7 730083	80 548333	27 70	6 62	2016	0	1
LS	Maca a	plastic	7 730889	80 546972	31 27	7 73	2016	0	1
LS	P t ll		7 628306	80 176306	31 07	6 05	2016	0	1
LS	Paritilla	plastic	7 628417	80 177417	28 42	7 44	2016	1	1
LS	Parit lla	plastic	7 631222	80 174694	29 03	7 46	2016	1	0
LS	Pedas	bber	7 531666	80 029444	NaN	NaN	2017	1	1
LS	Pedasi	N/A	7 530694	80 025861	27 70	7 77	2016	1	0
LS	P dasi	plasti	7 532667	80 029833	20 27	7 52	2016	1	1
LS	P dasi	plastic	7 532667	80 029833	25 77	7 60	2016	1	1
LS	Tonosi	rubber	7 405277	80 435833	NaN	NaN	2017	1	1
LS	Tonosi	rubber	7 410833	80 109166	NaN	NaN	2017	0	1
LS	Tonosi	ceramic	7 404500	80 441222	25 30	7 05	2016	0	1
LS	Tonosi	plastic	7 404556	80 441306	30 37	6 17	2016	0	1
LS	Tonosi	rubb r	7 404556	80 441306	30 03	7 41	2016	0	1
LS	T nos	rubb r	7 405083	80 443139	28 24	6 25	2016	0	1
LS	Tonosi	metal	7 405750	80 440028	26 86	7 13	2016	0	1
LS	Tonos	plastic	7 405750	80 440028	25 50	7 17	2016	0	1
LS	Tonos	plast	7 410444	80 442889	28 17	5 04	2016	0	1

Prov nc a	Localidad	Mater al	Lat tud	I ong tud	T	pH	Ano	Ae aegypti	Ae albop ctus
PA	Chepo	rubber	9 161523	79 093247	31 87	6 76	2017	1	0
I A	Ch po	ubber	9 163473	79 095289	27 70	10 90	2017	1	1
I A	Ch l b e	ubbc	9 153200	79 615095	28 27	10 01	2016	0	1
PA	Ch l b e	ubbc	9 153290	79 618098	27 19	10 28	2016	0	1
I A	Ch l bre	ubber	9 153290	79 618098	26 93	10 44	2016	0	1
I A	Chilib e	metal	9 173405	79 611128	27 80	10 11	2017	0	1
I A	Ch l b e	plast c	9 173405	79 611129	28 03	9 71	2017	0	1
PA	Ch l bre	plast c	9 173405	79 611129	28 33	9 57	2017	0	1
VF	Sa ta Fe	plastic	8 249160	80 974030	23 87	8 58	2016	0	1

Cuadro S4 Sitios de cria hallados en talleres de llantas usadas en las carreteras de Panama durante 2016 y 2017

BT Bocas del Toro CH Chiriqui CL Cocle CN Colon LS Los Santos PA Panama VE Veraguas

Provincia	Localidad	Material	Latitud	Longitud	T	pH	Ano	Ae aegypti	Ae albopictus
BT	Changuinola	rubber	9 456300	82 518540	29 03	9 32	2016	1	0
BT	Changuinola	plastic	9 456300	82 518540	28 53	9 40	2016	1	0
BT	Changuinola	rubber	9 456300	82 518540	27 90	9 41	2016	1	0
CH	Bagala	plastic	8 467920	82 528040	25 87	9 43	2016	0	1
CH	Bagala	plastic	8 467920	82 528040	25 87	9 43	2016	0	1
CH	Boquete	rubber	8 774977	82 434058	17 80	11 23	2016	0	1
CH	Concepc on	rubber	8 517048	82 626451	26 80	10 05	2016	0	1
CH	Concepcion	rubber	8 517048	82 626451	26 53	10 10	2016	0	1
CH	Concepcion	rubber	8 517050	82 626450	23 77	9 70	2016	1	1
CH	Concepcion	rubber	8 517050	82 626450	23 60	9 72	2016	1	1
CH	Concepcion	rubber	8 517050	82 626450	23 63	9 75	2016	1	1
CH	David	rubber	8 442929	82 432870	29 30	9 98	2016	0	1
CH	El Jazmin	rubber	8 425374	82 366506	26 63	9 64	2016	0	1
CH	El Jazmin	rubber	8 425374	82 366506	27 83	10 02	2016	0	1
CH	Entrada a Horoncitos	rubber	8 335750	82 122580	25 13	8 15	2016	1	1
CH	Entrada a Horoncitos	rubber	8 335750	82 122580	27 23	8 07	2016	0	1
CH	Paso Canoas	rubber	8 527090	82 835570	25 23	9 71	2016	1	1
CH	Pueblito	rubber	8 264160	81 978830	27 73	8 78	2016	0	1
CH	Pueblito	rubber	8 264160	81 978830	26 37	8 90	2016	0	1
CH	San Pablo Viejo Abajo	rubber	8 452250	82 500750	25 00	9 49	2016	1	0
CH	San Pablo Viejo Abajo	rubber	8 452250	82 500750	25 73	9 45	2016	0	1
CH	San Pablo V ejo Abajo	rubber	8 452250	82 500750	25 53	9 47	2016	0	1
CH	San Pablo Viejo Abajo	rubber	8 452250	82 500750	26 20	9 50	2016	0	1
CH	Varital	rubber	8 494730	82 586830	25 93	9 62	2016	0	1
CH	Varital	rubber	8 494730	82 586830	24 83	9 70	2016	0	1
CH	Var tal	rubber	8 494730	82 586830	24 50	9 72	2016	0	1
CL	Aguadulce	rubber	8 245690	80 564180	27 63	8 44	2016	1	1
CL	Aguadulce	rubber	8 248160	80 554600	28 73	8 45	2016	1	1
CL	Aguadulce	rubber	8 248160	80 554600	28 70	8 45	2016	1	0
CL	AS GA_05	rubber	8 183093	80 649457	27 23	9 88	2017	1	1
CL	AS GA_08	rubber	8 237935	80 578257	30 27	9 79	2017	0	1
CL	Divisa	rubber	8 129600	80 687170	26 83	8 55	2016	0	1
CL	Santa Rita	rubber	8 237962	80 578154	28 30	10 30	2016	0	1
CN	AS1 GA_16	rubber	9 360557	79 829773	28 70	9 94	2017	1	0
CN	AS2 GA_15	rubber	9 339139	79 880007	25 20	7 36	2017	1	0
CN	AS2 GA_16	rubber	9 360557	79 829773	28 67	10 17	2017	1	0

Provincia	Localidad	Material	Lat tud	Longitud	T	pH	Ano	Ae aegypti	Ae albopictus
CN	AS3 GA_16	rubber	9 360557	79 829773	26 90	12 40	2017	0	1
CN	Cativa	plastic	9 360310	79 829850	25 80	8 39	2016	0	1
CN	Cativa	rubber	9 360310	79 829850	25 87	8 67	2016	0	1
CN	Cativa	rubber	9 360310	79 829850	25 03	8 74	2016	0	1
CN	Portobelo	rubber	9 553480	79 648060	28 10	8 67	2016	1	0
CN	Portobelo	metal	9 553480	79 648020	27 87	8 76	2016	0	1
LS	Macaracas	rubber	7 729500	80 553061	28 40	7 53	2016	0	1
LS	Pedasi	rubber	7 533194	80 025472	29 80	7 43	2016	1	0
PA	AS GA_02	rubber	8 586700	79 885197	27 70	8 98	2017	1	0
PA	AS GA_03	rubber	8 467211	79 966148	28 13	9 08	2017	1	1
PA	Chilibre	rubber	9 153290	79 618098	27 13	10 28	2016	0	1
PA	Chilibre	rubber	9 153290	79 618098	26 93	10 44	2016	0	1
PA	Chilibre	rubber	9 153290	79 618098	28 27	10 61	2016	0	1
PA	La Chorrera	rubber	8 869380	79 802070	30 53	9 75	2016	1	1
PA	La Chorrera	rubber	8 869380	79 802070	31 60	9 46	2016	1	0
PA	La Chorrera	rubber	8 873140	79 795980	27 33	9 76	2016	1	1
PA	Panama	wood	9 039940	79 460210	28 97	9 90	2016	1	1
PA	Panama	rubber	9 062386	79 422378	27 30	10 79	2016	1	0
PA	Panama	rubber	9 062386	79 422378	27 27	10 81	2016	1	0
PA	Pedernal	rubber	9 122110	79 601780	30 20	8 65	2016	0	1
PA	Pedernal	rubber	9 122110	79 601780	29 07	8 66	2016	0	1
PA	San Carlos	plastic	8 527220	79 935660	32 00	8 14	2016	1	0
PA	San Carlos	rubber	8 528350	79 934830	30 97	8 57	2016	1	0
PA	San Martin	rubber	8 842430	79 840660	34 07	8 43	2016	1	0
PA	San Martin	rubber	8 842430	79 840660	32 70	8 53	2016	1	0
VE	AS GA_06	rubber	8 110707	80 772648	27 83	9 47	2017	0	1
VE	La Mesa	rubber	8 201766	81 185711	27 27	9 98	2016	0	1
VE	La Mesa	rubber	8 201766	81 185711	29 03	10 17	2016	0	1

Cuadro S5 Talleres de compra y venta de llantas usadas muestreados mediante ovitrampas y/o busqueda activa en Panama durante 2016 y 2017

BT Bocas del Toro CH Chiriqui CL Cocle CN Colon DA Darien LS Los Santos PA Panama VE Veraguas Positivo 1 Negativo 0

Provincia	Metodo	Latitud	Longitud	Ano	Ovipostura	*Ae aegypti*	*Ae albopictus*
BT	OT	9 452380	82 519180	2016	1	1	0
BT	OT	8 927310	82 183620	2016	0	0	0
BT	OT/BA	9 456300	82 518540	2016	1	1	0
CH	BA	8 774977	82 434058	2016	NA	0	1
CH	BA	8 527090	82 835570	2016	NA	1	1
CH	BA	8 442929	82 432870	2016	NA	0	1
CH	OT	8 514865	82 623787	2016	0	0	1
CH	OT	8 509217	82 613759	2016	0	0	0
CH	OT	8 441426	82 417297	2016	0	0	0
CH	OT	8 423509	82 363324	2016	0	0	0
CH	OT/BA	8 517048	82 626451	2016	0	1	1
CH	OT/BA	8 494732	82 586827	2016	0	0	1
CH	OT/BA	8 467922	82 528041	2016	0	0	1
CH	OT/BA	8 452246	82 500745	2016	1	1	1
CH	OT/BA	8 425374	82 366506	2016	1	0	1
CH	OT/BA	8 33575	82 122577	2016	1	1	1
CH	OT/BA	8 264158	81 978826	2016	0	0	1
CL	OT	8 511630	80 347420	2016	0	0	0
CL	OT	8 498620	80 334350	2016	1	0	1
CL	OT	8 335238	80 520934	2016	1	1	0
CL	OT	8 173490	80 662100	2016	1	0	1
CL	OT	8 45412	80 45022	2017	1	1	1
CL	OT	8 50114	80 33562	2016 2017	1	1	1
CL	OT	8 25387	80 54091	2016 2017	1	1	1
CL	OT/BA	8 378500	80 164350	2016	1	1	0
CL	OT/BA	8 248160	80 554600	2016	1	1	1
CL	OT/BA	8 245690	80 564180	2016	1	1	1
CL	OT/BA	8 18309	80 64946	2017	1	1	1
CL	OT/BA	8 23794	80 57826	2016 2017	1	0	1
CN	BA	9 553480	79 648060	2016	NA	1	1
CN	OT	9 263140	79 681320	2016	1	0	1
CN	OT	9 266092	79 686033	2017	1	0	1
CN	OT	9 201626	79 626107	2017	1	0	1
CN	OT	9 145762	79 621817	2017	1	0	0
CN	OT	9 115119	79 567957	2017	1	0	0
CN	OT	9 295975	79 776166	2016 2017	1	1	1

Provincia	Metodo	Latitud	Longitud	Ano	Ovipostura	*Ae aegypti*	*Ae albopictus*
CN	OT/BA	9 339139	79 880007	2017	1	1	1
CN	OT/BA	9 360450	79 829780	2016 2017	1	1	1
DA	OT	8 78215	78 17955	2017	1	0	0
LS	BA	7 775786	80 271306	2016	NA	0	0
LS	BA	7 736419	80 279094	2016	NA	0	0
LS	BA	7 729500	80 553061	2016	NA	0	1
LS	BA	7 729500	80 553061	2016	NA	0	0
LS	BA	7 533278	80 025528	2016	NA	0	0
LS	BA	7 533278	80 025528	2016	NA	0	0
LS	BA	7 533278	80 025528	2016	NA	0	0
LS	BA	7 533278	80 025528	2016	NA	0	0
LS	BA	7 533194	80 025472	2016	NA	1	0
PA	BA	9 153290	79 618098	2016	NA	0	1
PA	OT	9 201780	79 626200	2016	1	0	1
PA	OT	9 187500	79 617060	2016	1	0	0
PA	OT	9 159600	79 621070	2016	0	0	0
PA	OT	9 136830	79 620980	2016	1	0	1
PA	OT	9 111190	79 557580	2016	1	0	1
PA	OT	9 102699	79 362158	2016	1	1	0
PA	OT	9 10208	79 385112	2016	0	0	0
PA	OT	9 100512	79 327616	2016	1	0	0
PA	OT	9 100427	79 331762	2016	1	0	0
PA	OT	9 100156	79 322797	2016	1	1	0
PA	OT	9 098597	79 296693	2016	1	0	0
PA	OT	9 098228	79 29118	2016	0	0	0
PA	OT	9 091938	79 394803	2016	1	0	0
PA	OT	9 059452	79 430712	2016	0	0	0
PA	OT	9 046270	79 445710	2016	1	1	0
PA	OT	9 039940	79 460210	2016	1	0	0
PA	OT	9 025130	79 485060	2016	1	1	1
PA	OT	9 021320	79 515660	2016	1	0	1
PA	OT	9 019520	79 492140	2016	1	1	0
PA	OT	9 018830	79 492880	2016	1	1	0
PA	OT	9 009780	79 506080	2016	1	1	0
PA	OT	9 005570	79 520430	2016	1	1	0
PA	OT	8 952910	79 547300	2016	1	0	0
PA	OT	8 941730	79 679020	2016	0	0	0
PA	OT	8 934110	79 690550	2016	0	0	0
PA	OT	8 931460	79 699770	2016	1	1	0
PA	OT	8 929480	79 703840	2016	1	1	0
PA	OT	8 929170	79 704430	2016	1	0	1
PA	OT	8 925810	79 714400	2016	1	0	1
PA	OT	8 925360	79 715000	2016	0	0	0
PA	OT	8 889900	79 764170	2016	1	1	1

Provincia	Metodo	Latitud	Longitud	Ano	Ovipostura	*Ae aegypti*	*Ae albopictus*
PA	OT	8 874160	79 792290	2016	1	1	1
PA	OT	8 860080	79 808170	2016	1	1	0
PA	OT	8 593480	79 886890	2016	1	0	0
PA	OT	8 52727	79 93574	2017	1	1	1
PA	OT	8 783690	79 873610	2016 2017	1	1	0
PA	OT/BA	9 122110	79 601780	2016	1	0	1
PA	OT/BA	9 062386	79 422378	2016	1	1	0
PA	OT/BA	9 039940	79 460210	2016	0	1	1
PA	OT/BA	8 873140	79 795980	2016	1	1	1
PA	OT/BA	8 869380	79 802070	2016	1	1	1
PA	OT/BA	8 528350	79 934830	2016	1	1	0
PA	OT/BA	8 527220	79 935660	2016	1	1	0
PA	OT/BA	8 74145	79 88215	2017	1	1	1
PA	OT/BA	8 58670	79 88520	2017	1	1	0
PA	OT/BA	8 84236	79 84049	2016 2017	1	1	0
PA	OT/BA	8 46721	79 96615	2016 2017	1	1	1
VE	BA	8 117410	80 967210	2016	NA	0	0
VE	OT	8 110220	80 775230	2016	1	0	0
VE	OT/BA	8 201766	81 185711	2016	0	0	1
VE	OT/BA	8 12953	80 68734	2016 2017	1	0	1
VE	OT/BA	8 110690	80 772670	2016 2017	1	0	1