

UNIVERSIDAD DE PANAMA

VICERRECTORIA DE INVESTIGACION Y POSTGRADO

PROGRAMA CENTROAMERICANO DE MAESTRIA FN ENTOMOLOGIA

DINAMICA DEL HABITAT LARVAL E INTERACCION

ECOLOGICA DE *Aedes aegypti* Y *Aedes albopictus* EN

AMBIENTES ANTROPICOS DE PANAMA

POR

CARMELO GOMEZ MARTINEZ

2017

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 mí 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. Baraza Lvon Magnusson Marcela Diaz Karlin Driesse y Jaime Cerro por su apoyo en el trabajo de campo en sus visitas a Panama

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 Lyda 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. Arellys 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 Diaz y el resto de personal administrativo por toda su ayuda

En el Programa Centroamericano de Maestría en Entomología debo agradecer al profesorado que de una manera u otra contribuyó a mi educación como entomólogo así como a la Licenciada Vickelda Pérez por su ayuda administrativa. En especial agradecer al Doctor Enrique Medianero y al M.Sc. Percis Garces por su asesoramiento y corrección de este manuscrito. Al resto de mis compañeros de clase Tomás Ríos, Ernesto Bonadies y Pamela Polanco por el apoyo y las pintas compartidas estos años. También a mis buenas amigas Ana Cecilia y Candy por hacer de mi último año en Panamá más llevadero.

Agradecer también a la Secretaría Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación de Panamá (SENACYT) por la financiación y el apoyo al proyecto.

Por último, pero no menos importante, deseo agradecer al programa de becas FLLLOW MUNDUS y todo su equipo, así como a la Universidade Nova de Lisboa por darme la oportunidad de vivir una maravillosa experiencia en el trópico, gracias a la cual he obtenido la experiencia necesaria para continuar mi carrera como científico.

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 fisico quimica del habitat larval y la composicion bacteriana en <i>Aedes aegypti</i> y <i>Aedes albopictus</i> 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 Recoleccion 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 <i>Aedes aegypti</i> y <i>Aedes albopictus</i>	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 <i>Aedes aegypti</i> y <i>Aedes albopictus</i> 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 <i>Aedes</i> asistida por humanos	38
2.2 Objetivos	41
2.3 Material y metodos	
2.3.1 Recoleccion 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

3 1 1 Variables físico químicas del habitat larval	49
3 1 2 Composición bacteriana	50
3 1 3 <i>Aedes aegypti</i> y <i>Aedes albopictus</i> en talleres	55
3 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 cría encontrados en residencias y talleres durante los años 2016 y 2017	23
Figura 2	Proporción de OIUs en cada muestra analizada de <i>Aedes aegypti</i> y <i>Aedes albopictus</i>	25
Figura 3	Curva de acumulación de OIUs encontrados en el análisis de 1000 secuencias por muestra	26
Figura 4	Los 20 OIUs más frecuentes en <i>Aedes aegypti</i> y <i>Aedes albopictus</i>	28
Figura 5	Presencia de <i>Wolbachia</i>	31
Figura 6	Los 20 OIUs más frecuentes en los talleres y residencias muestreados	31
Figura 7	Diversidad microbiana a nivel de género en diferentes materiales como sitios de cría	32
Figura 8	Los 20 OIUs más abundantes en larvas de <i>Aedes aegypti</i> en comparación con sus frecuencias en adultos	32
Figura 9	Los 20 OIUs más abundantes en larvas de <i>Aedes aegypti</i> en comparación con sus frecuencias en adultos	33
Figura 10	Total de talleres de compra y venta de llantas usados georreferenciados durante los años 2015 y 2016	43
Figura 11	Talleres positivos para huevos de <i>Aedes</i>	49
Figura 12	Presencia de <i>Aedes aegypti</i> y/o <i>Aedes albopictus</i> en ovitrampas y sitios de cría en talleres	50

ANEXO I FIGURAS

Figura S1	Ejemplo de sitios de cría donde pueden encontrarse <i>Aedes aegypti</i> y/o <i>Aedes albopictus</i>	78
Figura S2	Muestra de residencias visitadas durante los años 2016 y 2017	79
Figura S3	Muestra de talleres visitados durante los años 2016 y 2017	80
Figura S4	Metodología de recolección y manejo de muestras	81
Figura S5	Caracteres para la identificación taxonómica de larvas y adultos de <i>Aedes aegypti</i> y <i>Aedes albopictus</i>	82
Figura S6	Histograma de distribución de las medidas de temperatura y pH	83
Figura S7	Cuadrícula de correlación entre temperatura y pH	84
Figura S8	Distribución de las OIUs encontradas en distintas categorías	85
Figura S9	Diversidad de flora microbiana encontrados en <i>Aedes aegypti</i> y <i>Aedes albopictus</i>	86
Figura S10	Fotografía de huevos del género <i>Aedes</i> encontrados en ovitrampas	87

INDICE DE CUADROS

Cuadro 1	Especímenes utilizados en el análisis de comunidad microbiana por especie, estadio y lugar	18
Cuadro 2	Resultados de la selección de modelo por AICc para cada especie	23
Cuadro 3	Índices de diversidad y equidad de la comunidad bacteriana	29
Cuadro 4	Relaciones significativas entre la abundancia de OIUs con respecto a la temperatura	34

ANEXO II CUADROS

Cuadro S1	Rangos de tolerancia y temperatura óptima (°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 cría hallados en residencias en localidades de Panamá durante 2016 y 2017	91
Cuadro S4	Sitios de cría hallados en talleres de llantas usadas en las carreteras de Panamá durante 2016 y 2017	94
Cuadro S5	Talleres de compra y venta de llantas usadas muestreados mediante ovitrampas y/o búsqueda 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 República de Panamá ha sido muy distinta, ambas especies se encuentran hoy en día presentes y ampliamente distribuidas en el territorio nacional. Ambas especies tienen preferencias de hábitat larvario muy similares y pueden llegar a coocurrir en los mismos sitios de cría, habitualmente llantas usadas, tanques plásticos de agua y otros recipientes de origen antropico capaces de acumular agua.

Para entender la relación de estas especies en su estado larval con los hábitats que ocupan, así como para conocer sobre posibles patrones de competencia, en 2016 y 2017 se llevó a cabo un extenso muestreo a lo largo y ancho del país en el que se recolectaron estadios inmaduros de sitios de cría 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 físico-químicas. Así mismo se estudió la composición de la comunidad microbiana presente en estas especies con el objetivo de encontrar patrones que expliquen la distribución de *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus*.

Aedes aegypti no se vio afectada por la variación 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 país, distantes entre sí, 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 distribución y dispersión de *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus*, se muestrearon mediante ovitrampas y búsqueda activa un total de 101 talleres a lo largo de las principales vías de circulación del país. Alrededor del 81% de los talleres muestreados fueron positivos para huevos de *Aedes*, un porcentaje elevado y representativo de la situación actual. De los 69 talleres donde se consiguió información a nivel de especie, *Aedes aegypti* apareció en 44 y *Aedes albopictus* en 48. Un análisis de co-ocurrencia indica que las especies se encuentran en exclusión competitiva. La distribución espacial de las especies es heterogénea, lo que parece indicar que la predominancia de una especie en un territorio con respecto a la otra está condicionada por otros factores más allá 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 tires, 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 mosquitoes in breeding sites in familiar houses and used tires 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 for lower temperatures than *Aedes aegypti*. Microbial diversity was higher in *Aedes aegypti* than *Aedes albopictus*. *Wolbachia* was found 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 tires 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-occurrence 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 species on the other is probably conditioned by other factors besides their effectivity to breed and travel in used tires.

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 geográfico, ambas especies son muy similares desde el punto de vista ecológico y de salud pública, ya que son capaces de transmitir numerosos Arbovirus o *virus transmitidos por artropodos*, algunos de ellos de gran relevancia epidemiológica (Kraemer *et al.* 2015).

Aedes aegypti es una especie de origen africano conocida comúnmente como el mosquito de la fiebre amarilla, aunque esta enfermedad está actualmente menos extendida gracias a la vacunación, y se le asocia más con la transmisión de dengue, chikungunya y zika (Barrett & Higgs 2007). Powell & Tabachnick (2013) en su revisión sobre la domesticación y dispersión de *Aedes aegypti* en las Américas, describen que este mosquito fue introducido en el continente americano desde África por medio de navíos durante los primeros años de la colonización y posiblemente llevó consigo el virus de la fiebre amarilla. Este virus, que hasta el momento era desconocido en América, causó su primera epidemia en Yucatán, México, 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 introducción no está claro, se cree que llegó desde América o desde el norte de África tras la apertura del Canal de Suez. Actualmente, *Aedes aegypti* se encuentra distribuido ampliamente por los trópicos 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 trópicos, así como también como en las regiones templadas (Kraemer 2015). La historia de invasión en América de *Aedes albopictus* es diferente a la de *Aedes aegypti*, ya que se considera que colonizó

el continente hace alrededor de 30 años debido principalmente al comercio internacional de llantas usadas (Yee 2016) Epidemiológicamente hablando *Aedes albopictus* también es relevante ya que es capaz de transmitir más de 20 arbovirus entre los que se encuentran dengue, chikungunya y Nilo occidental (Moore & Mitchell 1997) Pese a que no parece envuelto en la transmisión 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 ecológico debido a que ambas especies se crían habitualmente en contenedores artificiales tales como tanques plásticos recipientes de cerámica y llantas que acumulan agua producto de actividades humanas (Preechaporn *et al* 2006) Prácticamente cualquier objeto capaz de almacenar agua es susceptible a la infestación por estas especies de mosquitos *Aedes albopictus* también es capaz de explotar hábitats naturales tales como los huecos de árboles en el bosque y las plantas de jardín en áreas residenciales (Işuda & Işkağı 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 ecológicos como la competencia por espacio recurso y pareja (Braks *et al* 2004)

Los adultos de *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus* difieren ligeramente en sus hábitos alimenticios Mientras que las hembras de *Aedes albopictus* son generalistas y se alimentan de diversas especies de mamífero incluidos los seres humanos (Delatte *et al* 2010) las hembras de *Aedes aegypti* son especialmente antropofílicas (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 Del itte *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 cría (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 (Omeara *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 antitropicos 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 cría 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 validar 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 teórico

1.1.1 Determinantes ambientales del hábitat larval

Aedes aegypti y *Aedes albopictus* deben parte de su éxito ecológico 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 plástico, las llantas usadas y los objetos de cerámica 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 interacción entre factores abióticos como la temperatura, el pH o la disponibilidad de nutrientes, y factores bióticos como la simbiosis bacterianas, la depredación 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 más 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 distribución 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 más importantes en términos de salud pública (Cuadro S1). La mayor parte de estos estudios se basa en la cría de especímenes en

laboratorio a distintos intervalos de temperatura para comprobar el efecto de esta en los rasgos de la historia natural por ejemplo la duración 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 óptima de desarrollo entre los 20 C y los 30-35°C por debajo y por encima de este intervalo el desarrollo se ralentiza drásticamente y en los umbrales límite el desarrollo no culmina.

La mayoría de estos estudios se realizaron con temperaturas constantes sin tener en cuenta la fluctuación diurna 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 comparación con las condiciones naturales donde la temperatura es variable (Carlington *et al.* 2013). La velocidad de desarrollo máxima no siempre coincide con una tasa mayor de supervivencia hasta el estado adulto. Bayoh & Lindsay (2003) describieron que pese a obtener ciclos más cortos a temperaturas entre 30 y 32 C la supervivencia fue mayor a temperaturas menores. En conclusión los estudios más recientes sitúan el rango de tolerancia de *Aedes aegypti* entre 8-5°C (Tsuda & Takagi 2001) y 39 C (Marrinho *et al.* 2016) mientras que *Aedes albopictus* podría criarse a temperaturas de entre 5-3 C (Tsuda & Takagi 2001) y 40°C (Delatte *et al.* 2009).

1.1.2 pH

El pH es otro de los factores que habitualmente influye en la vida de los organismos acuáticos. Tanto valores de pH ácidos como alcalinos pueden resultar tóxicos 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 respiracion 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 conclusion 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 supervivencia de los estados inmaduros de los mosquitos se considera importante como indicador 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 (Meiritt *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 empobrecimiento 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 evolucion 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 adquisición de nutrientes (Human Microbiome Project Consortium 2012) Es tan estrecha esta relación que se propuso el término holobionte como unidad biológica que comprende tanto al organismo hospedero como también a todos los microorganismos asociados a él (Richardson 2017) En los insectos las bacterias están involucradas en importantes funciones como la nutrición la producción el desarrollo y la defensa contra enemigos Por ejemplo surten de aminoácidos esenciales o vitaminas a sus hospederos (Douglas 1998) o confieren resistencia contra algunos parásitos (Guay *et al* 2009)

Bacterias de los géneros *Serratia* y *Enterobacter* contienen enzimas hemolíticas que facilitan la digestión de la sangre en dípteros 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)

También hay bacterias que colonizan los órganos reproductores y manipulan la reproducción de sus insectos hospederos para dispersarse más eficientemente en sus poblaciones La más conocida es la bacteria *Wolbachia* un endosimbionte intracelular y heredable por vía materna que se encuentra en distintos grupos de artrópodos (Werren *et al* 2008) *Wolbachia* induce incompatibilidad citoplasmática en los insectos entre otros efectos Esto evita que machos infectados tengan prole viable con hembras no infectadas o infectadas con otra cepa de *Wolbachia* (Guruprasad *et al* 2014)

Wolbachia está siendo estudiada como controlador potencial de mosquitos vectores con énfasis en el género *Aedes* y puede encontrarse en poblaciones salvajes de *Aedes albopictus* (Ommetschke *et al* 2011) Generalmente se considera que la especie *Aedes aegypti* no está infectada con *Wolbachia* de forma natural y la literatura más actual así lo refleja (Pain *et al* 2017) No obstante en 2016 Coon y colaboradores encontraron

especímenes salvajes de *Aedes aegypti* infectados con *Wolbachia* en Florida, EEUU, siendo este el único reporte hasta la fecha. De una manera u otra, tanto *Aedes aegypti* como *Aedes albopictus* pueden ser infectadas en laboratorio con la cepa de wMel de *Drosophila melanogaster*, la cual ha probado ser muy efectiva en la inducción de incompatibilidad citoplasmática y dispersándose 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 sí sola en la población de mosquitos, hay que añadir la capacidad que tiene esta bacteria simbiote de modificar la competencia vectorial, haciendo a los mosquitos menos efectivos en la transmisión de patógenos. Por ejemplo, es capaz de bloquear la transmisión de Dengue, Chikungunya, Zika y *Plasmodium* en *Aedes aegypti* (Moreira *et al.* 2009, Walker *et al.* 2011, Dutra *et al.* 2016), así como también 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 población de *Aedes aegypti*. Hoffmann y colaboradores (2011) liberaron individuos de *Aedes aegypti* infectados con la cepa wMel en dos localidades de Australia, logrando una dispersión significativa de la bacteria en la población de mosquitos.

Por otro lado, contrario al efecto de *Wolbachia*, algunas bacterias potencian las capacidades del vector para transmitir el patógeno, como en el caso de la mosca tsetse *Glossina*, cuyo simbiote *Sodalis glossinivorus* mejora la capacidad vectorial de la tripanosomiasis africana (Iatrou *et al.* 2010).

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

mentación larvaria que los mosquitos adquieren del medio la mayor parte de las bacterias que componen 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 físico químicas 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 métodos

1.3.1 Recolección activa de estadios inmaduros y toma de datos

Las recolecciones de mosquitos se llevaron a cabo entre 2015 y 2017 en localidades urbanas y rurales de todas las provincias y en algunas comarcas indígenas del país. También se recolectaron mosquitos en talleres para la compra y venta de llantas usadas a lo largo de las carreteras primarias de Panamá (Cuadros S3 y S4).

El procedimiento consistió en la búsqueda activa de recipientes con agua susceptible a la infestación con estadios inmaduros de *Aedes aegypti* y/o *Aedes albopictus* (Fig. S1). Esta búsqueda se llevó a cabo en jardines y patios de viviendas de las distintas localidades (Fig. S2) así como también en los talleres visitados previo consentimiento de los inquilinos y/o propietarios (Fig. S3). Para cada recipiente positivo encontrado se tomaron las coordenadas geográficas del punto, se midió el pH y la temperatura del agua, y se categorizó el tipo de recipiente. Los especímenes (larvas y pupas) eran recolectados en bolsas Whirl Pak (Whirl Pak® Nasco, USA) y transportados al laboratorio con agua de sus respectivos cuaderos (Fig. S4).

1.3.2 Cría y manejo de especímenes en laboratorio

Las muestras fueron colocadas en cámaras de emergencia consistentes en vasos plásticos transparentes con una malla de tul cubriendo la apertura (Fig. S4). En estas cámaras los especímenes 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 taxonómicas en base a caracteres morfológicos de la larva de cuarto estado y del adulto (Rossi & Almiron 2004, Rueda 2004). Los principales caracteres utilizados para la identificación de las larvas fueron la forma de los dientes del peine caudal (con forma de triángulo en *Aedes aegypti* y con una sola púa larga en *Aedes albopictus*), las espinas torácicas (más grandes y conspicuas en *Aedes aegypti* que en *Aedes albopictus*) y la seta cefálica número VII (simple en *Aedes aegypti* y doble en *Aedes albopictus*) (Fig. S5). Los caracteres utilizados para la identificación de adultos fueron principalmente el patrón de escamas blancas del *notum* con forma de lira en *Aedes aegypti* y con una sola línea 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 análisis de la comunidad bacteriana.

1.3.3 Extracción de ADN y creación de librerías del gen 16S

La extracción de ADN de los mosquitos (larva o adulto) se realizó individualmente mediante el protocolo del Biosprint® 96 DNA blood kit y posteriormente se amplificó la región V4 del ARN 16S en reacciones de 12.5 µl usando los cebadores o primers F515 (5' G T G C C A G C M G C C G C G G T A A 3') y R806 (5' G G A C T A C H V G G G T W T C T A A T 3'). La concentración de reactivos y las condiciones utilizadas en la reacción 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 cría 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 Scrapure Beads (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) y usado como plantilla para una segunda PCR en la que se añadió las secuencias de adaptadores (Standard Illumina adaptors). Los productos de la segunda PCR fueron purificados con Scrapure Beads y la concentración de ADN igualada con 20 µl platos de normalización de Charm Biotech (Charm Biotech, San Diego, CA, USA) para crear las librerías.

En total 940 especímenes (470 de cada especie) fueron procesados para la extracción de ADN y creación de librerías. La porción de larvas y adultos y la procedencia de estos últimos (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. Especímenes utilizados en el análisis de comunidad microbiana por especie, estadio y lugar.

	<i>Aedes aegypti</i>		<i>Aedes albopictus</i>	
	Larva	Adulto	Larva	Adulto
Localidades	106	270	108	208
Talleres	0	94	0	94

1.3.4 Análisis de la comunidad bacteriana

El software QIIME v1.9 (Caporaso *et al.* 2010) y scripts de Python fueron utilizados para realizar los análisis con las secuencias de bacterias obtenidas con el gen ARNr 16S. Las Unidades Taxonómicas Operativas (OTUs) fueron seleccionadas con el protocolo de referencia abierta (`pick_open_reference_otus.py`) el cual identifica las secuencias comparándolas con una base de datos preexistente. Además, se estimó el número de OTUs para cada especie de mosquito, tipo de criadero y en relación con los valores de pH y temperatura del agua. Para evitar posibles errores en la asignación de OTUs debidos a errores aleatorios de secuenciación, se eliminaron de los análisis todas aquellas secuencias cuya frecuencia de aparición era menor de 0.005% (Bokulich *et al.* 2013).

Para estimar el grado de disimilitud (distancia) entre dos comunidades bacterianas utilizamos la métrica Unifrac. La distancia Unifrac se basa en la fracción de la longitud de la rama compartida entre dos comunidades dentro de un árbol filogenético construido mediante secuencias genéticas de ARNr 16S de todas las comunidades comparadas. Una distancia Unifrac relativamente pequeña implica que las dos comunidades son similares en su composición con linajes y que comparten una historia evolutiva común. 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 está ponderada basándose en las abundancias relativas de los linajes dentro de las comunidades. Se estimó la curva de acumulación de OTUs, el índice de diversidad de Shannon-Wiener que tiene en cuenta la riqueza de OTUs y la proporción de los mismos y el índice de equidad de Pielou que considera la proporción

de la diversidad observada con relación a la máxima diversidad esperada. Se realizaron test de comparación de medianas con la prueba de U Mann Whitney Wilcoxon en el software estadístico 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 utilizó el análisis de similitud ANOSIM mediante el script *compare_categories.py* in QIIME para confirmar diferencias en la composición de la comunidad bacteriana entre tipos de criadero. ANOSIM es un test estadístico no paramétrico que compara distancias clasificadas de diversidad beta entre diferentes grupos y calcula un valor de p y un coeficiente de correlación por permutación. Para estimar posibles cambios en la comunidad microbiana en relación con la variación de temperatura y pH se realizaron sendos análisis de correlación de Pearson mediante el script de Python *observation_metadata_correlation.py* in QIIME.

1.3.5 Análisis de la temperatura y el pH

La normalidad de las variables temperatura y pH se analizó mediante un test de Shapiro Wilk en el software Past3 (Hammer *et al.* 2001). Pese a que el pH está inversamente relacionado con la temperatura (es decir que a mayor temperatura el pH es más ácido y viceversa) esta relación es observada únicamente para agua pura y la oscilación de pH es muy lenta en comparación a la variación 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. fácilmente enmascaran esta relación. Para confirmar esto se realizó una prueba estadística de correlación de Pearson entre estas dos variables en los criaderos positivos.

Posteriormente se realizó un análisis de regresión logística para contrastar la presencia y ausencia de *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus* con los valores de temperatura

y pH del agua en los ciudados. 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 *Acides*). 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 género *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 contenían *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 encontró en el 51% de los criaderos mientras que *Aedes albopictus* en el 62% de los casos.

1.4.1 Análisis de Temperatura y pH

Tanto la temperatura como el pH siguen una distribución normal (Temperatura $W = 0.99$ y $p \text{ valor} = 0.35$, pH $W = 0.98$ y $p \text{ valor} = 0.18$) (Fig. S6). La temperatura varió entre 23.60°C y 34.84°C con una media de 27.9°C mientras que el pH osciló entre 5.51 y 12.4 con una media de 8.57.

1.4.2 Análisis de correlación y modelos de regresión logística

No se encontró una correlación de tipo lineal o monótona estadísticamente 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 también 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.

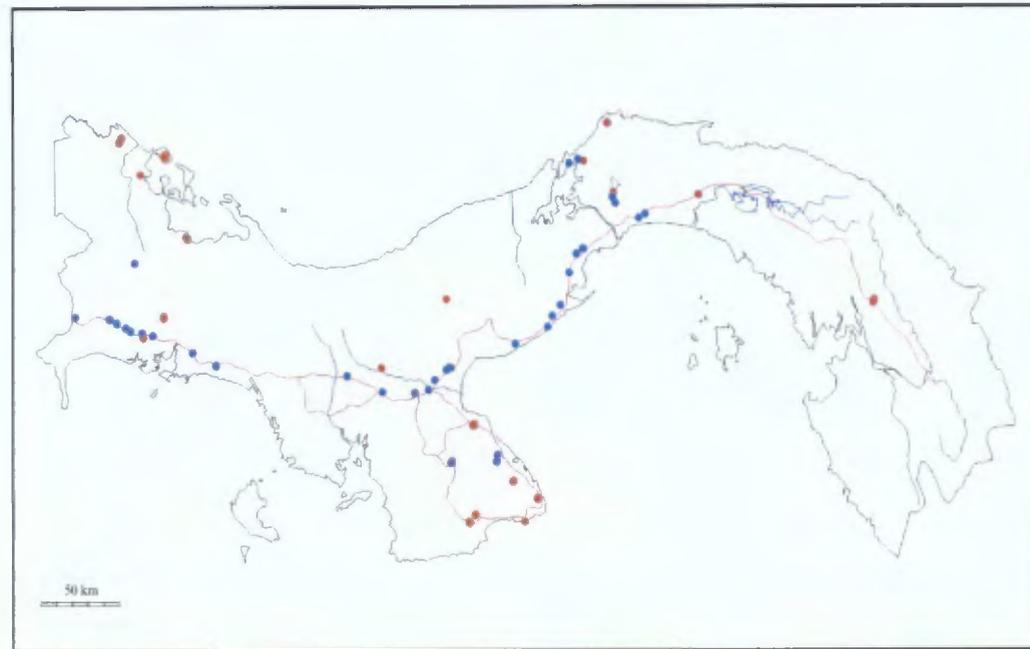


Figura 1. Mapa de los sitios de cría encontrados en residencias y talleres durante los años 2016 y 2017. En Rojo: búsqueda activa en residencias. Azul: búsqueda activa en talleres

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

<i>Aedes aegypti</i>								
Modelos	K	AICc	Delta_AICc	ModelLik	AICcWt	LL	Cum. Wt	
5	Nulo	1	231.281	0.000	1.000	0.399	-114.628	0.399
3	T ^a	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 ^a + pH	3	234.157	2.876	0.237	0.095	-114.004	0.922
1	T ^a * pH	4	234.545	3.264	0.196	0.078	-113.148	1.000
<i>Aedes albopictus</i>								
Modelos	K	AICc	Delta_AICc	ModelLik	AICcWt	LL	Cum. Wt	
3	T ^a	2	223.839	0.000	1.000	0.538	-109.882	0.538
2	T ^a + pH	3	225.094	1.256	0.534	0.287	-109.473	0.825
1	T ^a * 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 términos 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 únicamente temperatura es negativamente significativo ($Z = -2.680$, p valor = 0.00736) lo que indica que *Aedes albopictus* parece preferir temperaturas más bajas dentro del rango estudiado. El pH por el contrario no parece afectar de manera significativa la presencia de *Aedes albopictus*.

1.4.3 Análisis de la comunidad bacteriana

De las 190 muestras procesadas (150 pools de 6 mosquitos c/u y 40 especímenes individuales) 11 (3 individuos de *Aedes aegypti* y 8 pools de *Aedes albopictus*) fallaron en el proceso de extracción y amplificación 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 acumulación 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 géneros. Sobre el 67% de las secuencias leídas fue asignada hasta nivel de género y el 33% restante pudo únicamente asignarse a niveles superiores (Phylum, Clase, Orden o Familia) lo que sugiere la existencia de taxas no caracterizados aún. 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).

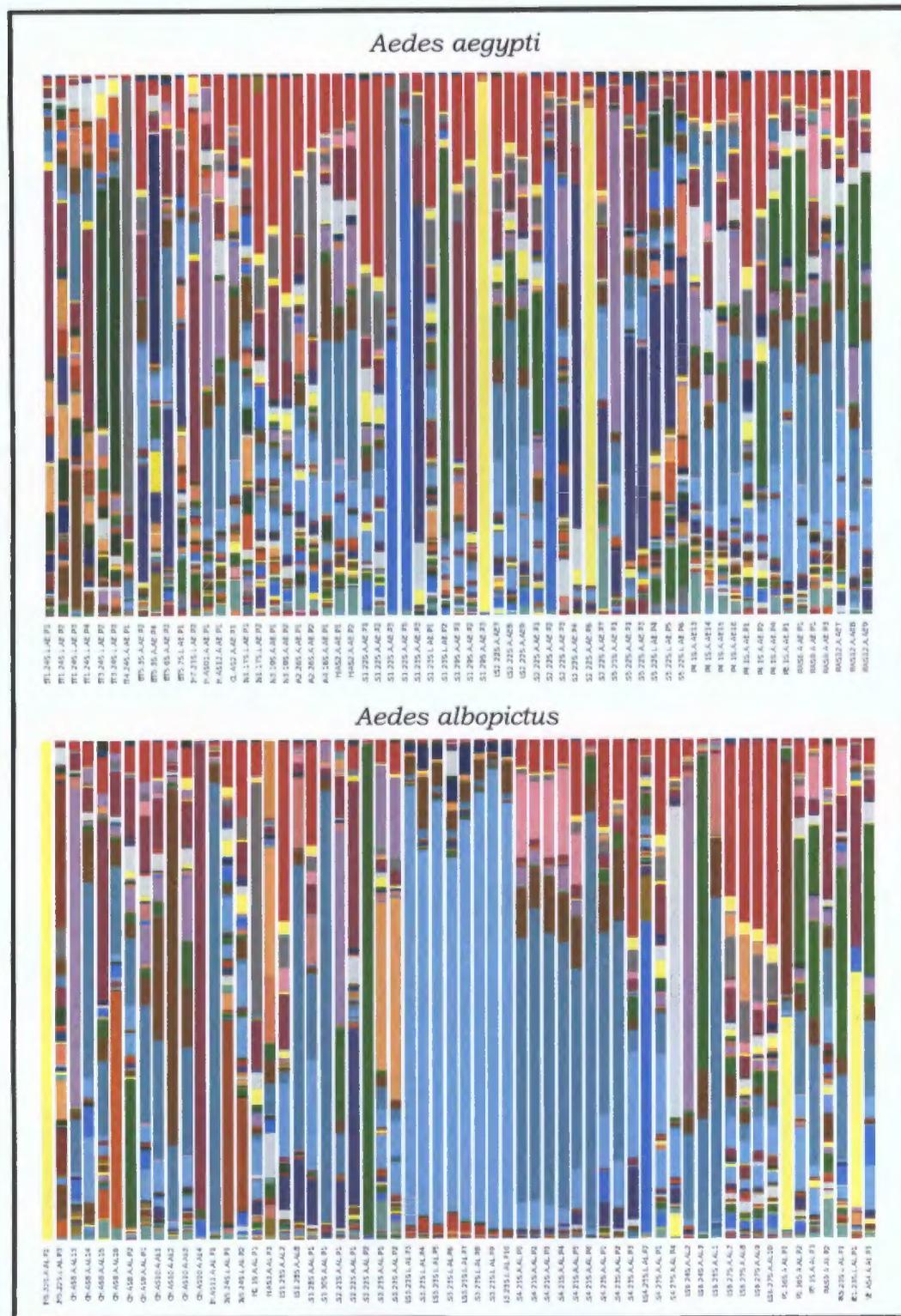


Figura 2. Proporción de OTUs en cada muestra analizada de *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus*

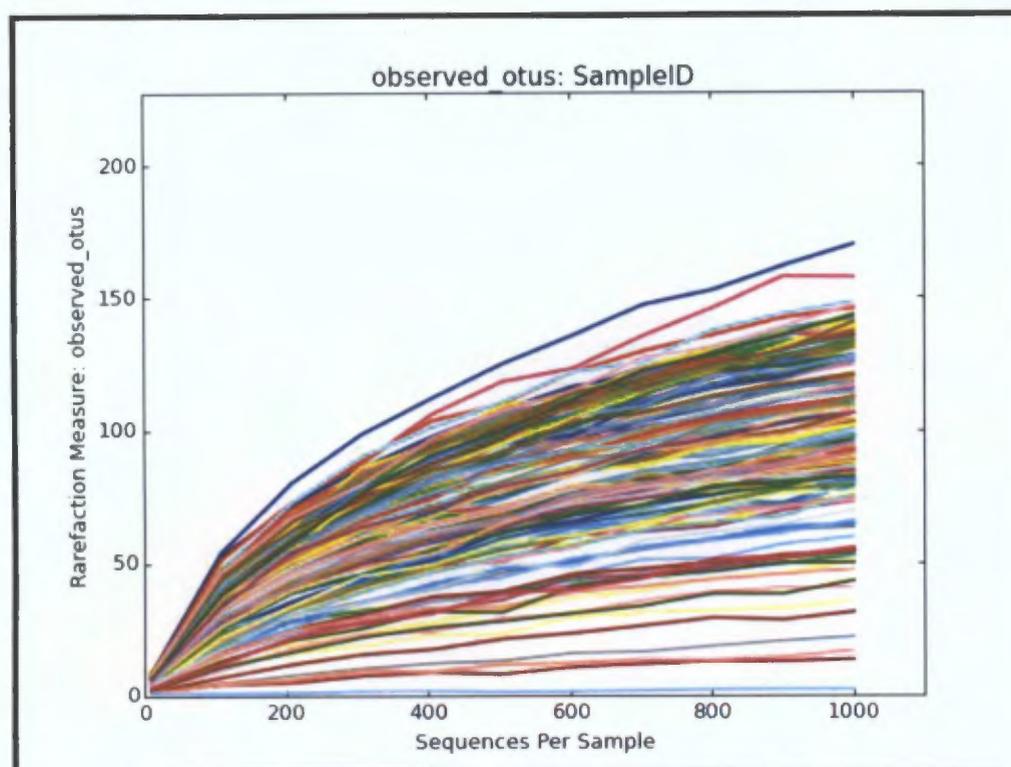


Figura. 3 Curva de acumulación de OTUs encontrados en el análisis de 1000 secuencias por muestra.

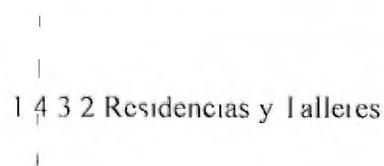
1.4.3.1 *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus*

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 ($W = 3634$, $p\text{-valor} = 0.0002$), 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 halló en las provincias de Chiriquí (3 criaderos de talleres, 2 de residencias), Herrera (1 en taller), Los Santos (13 en residencias), Panamá (1 en residencia, 8 en talleres) y Veraguas (1 en residencia y 1 en taller) (Fig. 5).



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 únicamente a residencias (Fig. S8). Hubo una diferencia estadísticamente significativa en la diversidad entre residencias y talleres ($W = 1322$, p valor = 0.001). Los índices 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 género *Acinetobacter* fue el más 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%.

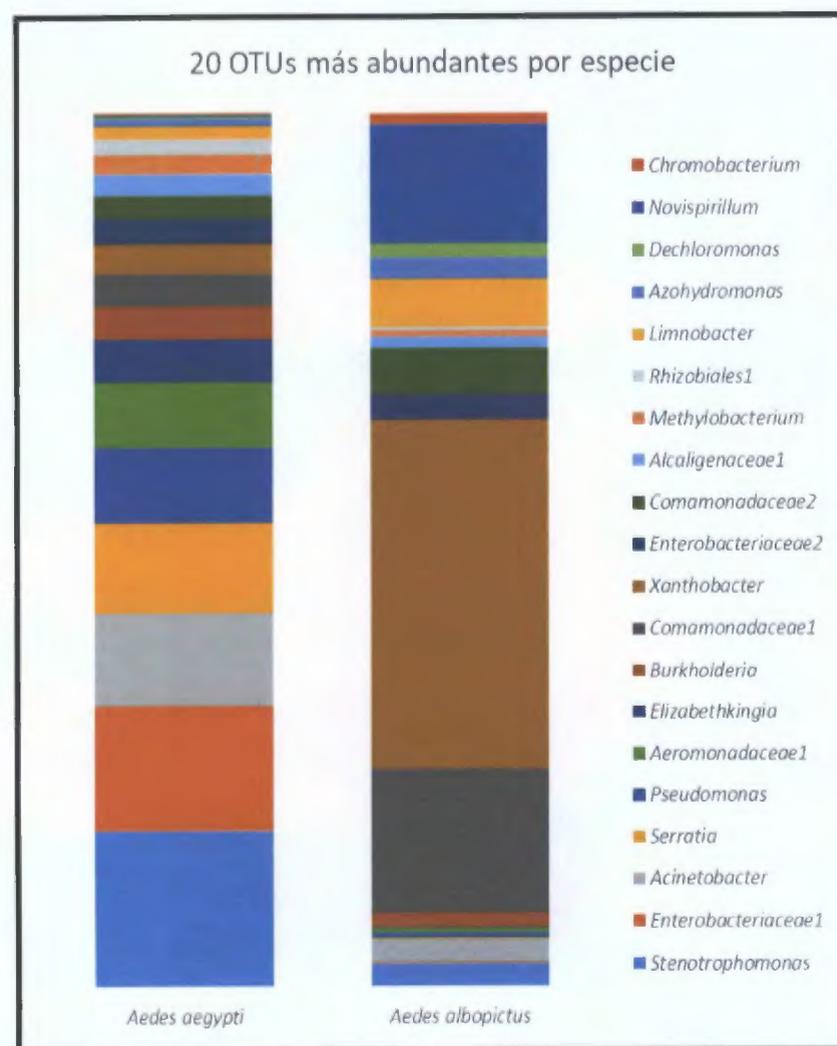


Figura 4. Los 20 OTUs más frecuentes en *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus*.

Cuadro 3. Índices de Shannon Wiener (H') y Igualdad de Jaccard (J') de la comunidad microbiana en las categorías estudiadas

	H'	J'
Especies		
<i>Aedes aegypti</i>	3.40	0.62
<i>Aedes albopictus</i>	2.56	0.47
Lugar		
Residencias	3.32	0.61
Talleres	3.12	0.57
Tipo de criadero		
Llantas	3.42	0.65
Tanques plásticos	3.22	0.59
Materia vegetal	1.60	0.29
Otros	2.81	0.52
Estadio		
<i>A. aegypti</i> (larva)	3.74	0.68
<i>A. aegypti</i> (Adulto)	2.99	0.55
<i>A. albopictus</i> (larva)	1.84	0.34
<i>A. albopictus</i> (Adulto)	2.60	0.48
Temperatura		
Baja	1.25	0.25
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

4.3.3 Tipo de criadero

Existe una diferencia significativa entre la composición de taxa microbianos entre los distintos tipos de sitios de cría ($R = 0.09$, p valor = 0.001). El 44% de los OTUs estuvieron presentes en todos los sitios de cría 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 más diversos las llantas ($H = 3.42$) y los tanques plásticos ($H = 3.22$)

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 índice de Shannon Wiener sugiere una diversidad más alta en larvas en contraposición a los adultos (H de 3.74 y 2.99 respectivamente) aunque las diferencias no parecen ser estadísticamente 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%), *Stenotrophomonas* (12.2%) y Alcaligenaceae (5.6%) que en adultos supusieron un 3.15 y 0.5% respectivamente. Los adultos presentaron principalmente Nitrobacteriaceae (15.6%), *Stenotrophomonas* (15.2%), *Serratia* (11.8%), *Acinetobacter* (11%) y *Pseudomonas* (8.5%) grupos que a excepción de *Stenotrophomonas* fueron bastante pobres 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 estadísticamente significativa ($W = 473$ p valor = 0.19). La equidad fue de 0.34 para larvas y 0.48 para adultos. El género *Xanthobacter* supuso en torno al 65% de toda la diversidad encontrada en larvas mientras que el mismo género disminuyó al 29% en adultos aunque siguió siendo el más abundante junto a Comamonadaceae (22.2%) (Fig. 9).

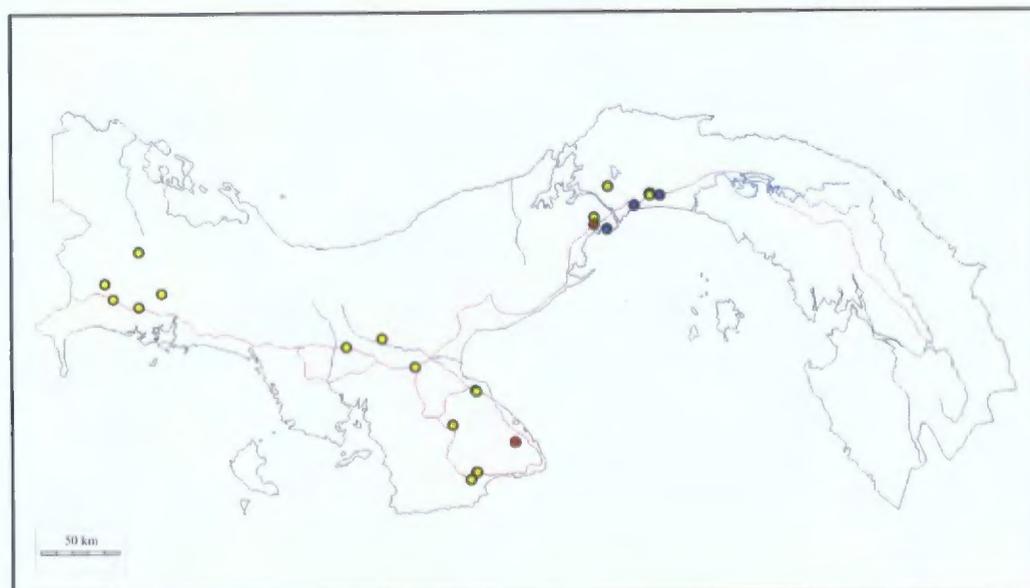


Figura 5. Presencia de *Wolbachia*. Azul: *Aedes aegypti*; Amarillo: *Aedes albopictus*; Rojo: Ambas especies.

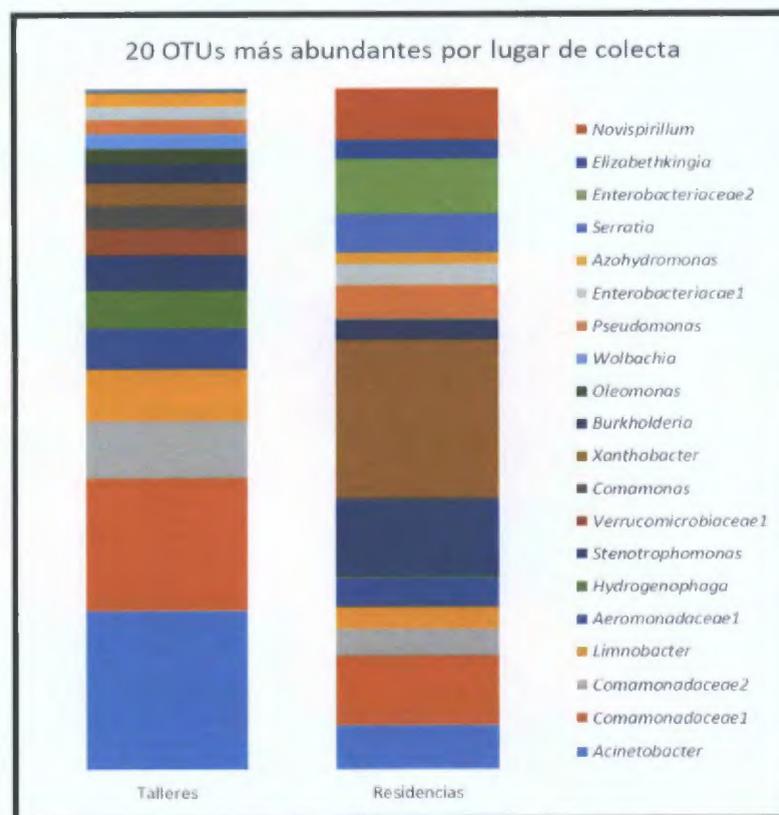


Figura 6. Los 20 OTUs más frecuentes en los talleres y residencias muestreados

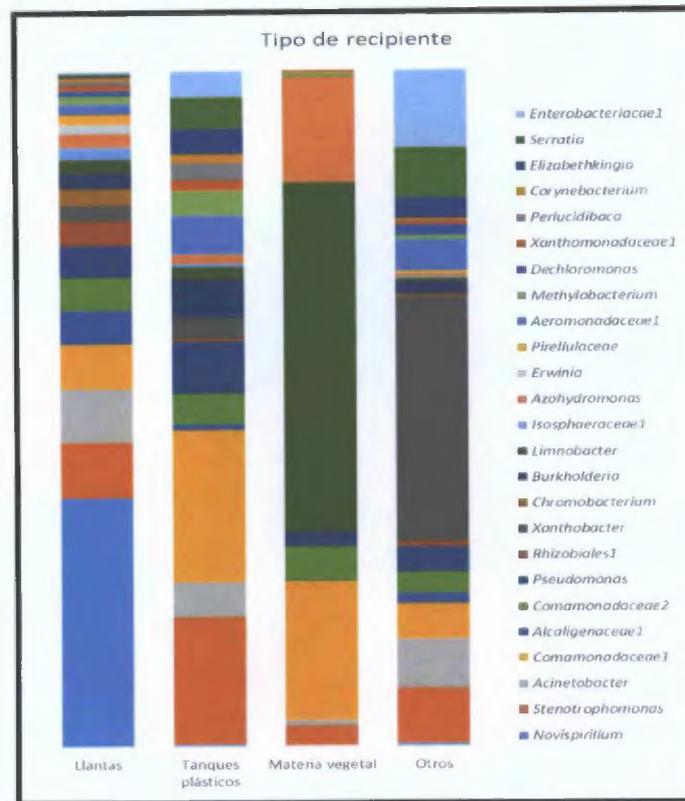


Figura 7. Diversidad microbiana a nivel de género en diferentes materiales como sitios de cría

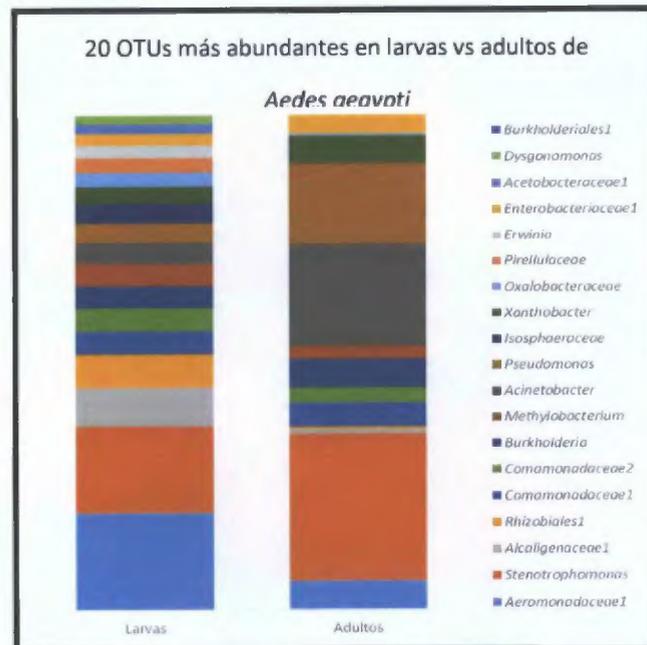


Figura 8. Los 20 OTUs más abundantes en larvas de *Aedes aegypti* en comparación con sus frecuencias en adultos.

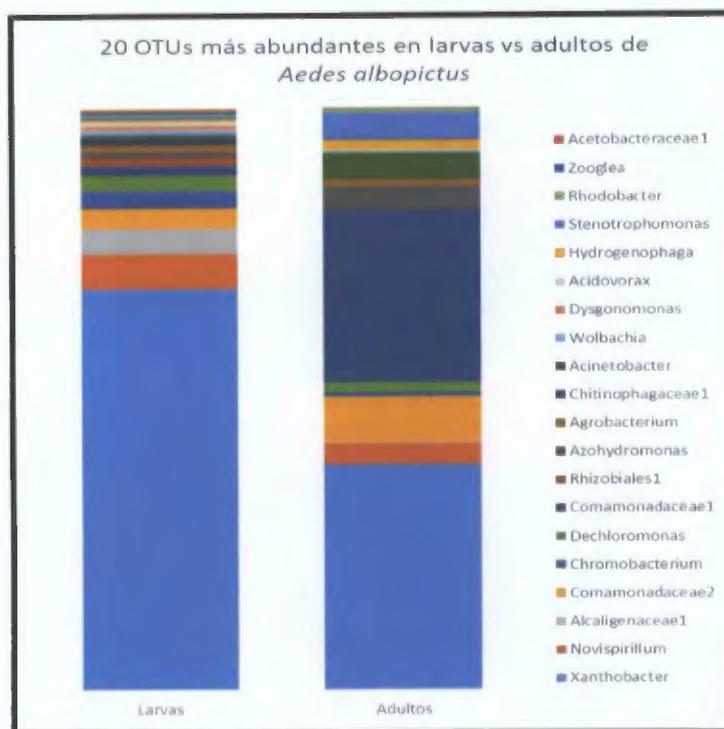


Figura 9. Los 20 OTUs más abundantes en larvas de *Aedes albopictus* en comparación con sus frecuencias en adultos.

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	0.50	0.002
Enterobacteriaceae1	0.51	0.004
Pseudomonadaceae1	0.524	0.005
Streptococcus	0.287	0.032
Comamonadaceae2	0.283	0.02

Resultados del análisis de correlación de Pearson

2.1 Marco teórico

2.1.1 Patrones de migración natural

La capacidad de dispersión de los mosquitos vectores es esencial para entender la dinámica de transmisión de enfermedades ya que el rango de vuelo y la dispersión determinan la dinámica poblacional del vector, la estructura genética y la transferencia de los patógenos en la población del vector (Service 1997).

Los estudios realizados para estudiar el movimiento y la capacidad de dispersión de *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus* se han basado principalmente en técnicas de Captura-Marcaje-Liberación y Recaptura (CMLR) y marcaje mediante Rubidio, aunque algunos investigadores han probado técnicas de marcaje genético (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 liberación en San Juan, Puerto Rico. Años después, Honorio & colegas (2003) utilizaron la misma técnica para observar la distancia máxima de dispersión de *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus* en Río 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 más de 320 m para ambas especies. Estos autores instalaron ovitrampas en el área de muestreo, la cual limpiaron de otros contenedores para incrementar la oviposición 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 máxima de desplazamiento que registraron fue de 512 metros. En 2009 David & otros estudiaron la dispersión de *Aedes aegypti* en una zona endémica de dengue en Rio de Janeiro mediante CMLR donde los mosquitos no viajaron más 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 cubrían mayores distancias si la densidad de sitios para ovipositar es baja mientras que permanecerán cercanas a donde se criaron si hay suficientes sitios de ovoposición 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 máxima observada de 290 m. El mismo año y también en Italia Bellini & colaboradores realizaron un experimento similar enfocado en la dispersión de *Aedes albopictus* y recapturaron individuos alejados hasta 350 metros del punto de liberación. En 2014 Beidonschot & Besse Lototsky realizaron una extensa revisión de literatura sobre la distancia de vuelo cubierta por distintos géneros de la familia Culicidae. Con todos los datos recopilados establecen una distancia máxima para los mosquitos del género *Aedes* de casi 3 km aunque basándose en trabajos con la técnica de CMLR la distancia de vuelo media para *Aedes aegypti* disminuye a 83.4 m y la de *Aedes albopictus* a 75 m.

Más recientemente Medeiros & colaboradores (2017) utilizaron una técnica de marcaje de larvas de *Aedes albopictus* mediante isótopos de Carbono 13 y Nitrógeno 15 después de lo cual capturaron casi el 100% de las hembras adultas en un kilómetro de su sitio de cría 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 espécimen de *Aedes aegypti* no se dispersa mas de 500 metros durante su vida. Además el tipo de habitat influiria en la dispersion ya que de acuerdo a Lacombe & 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 & Wuthiranyagool 1986) no obstante existen reportes de su existencia en el continente a mediados de los años cuarenta. Larvas vivas de esta especie 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 crían ha sido el principal vehiculo

para su colonización global. En 1987 Reiter & Sprenger publicaron datos sobre la exportación de llantas usadas por vía marítima entre 1978 y 1985 donde el número ascendió a más de 11.5 millones de llantas exportadas a nivel mundial solo desde los Estados Unidos de América. Los autores sugieren que debido al rápido avance de las tecnologías y la construcción de navíos más grandes, tales cifras aumentarían exponencialmente en años próximos.

En 1998 Reiter publicó otro trabajo sobre el comercio internacional de llantas usadas y la expansión de *Aedes albopictus* desde Japón hacia Norteamérica. También realiza una extensa descripción de datos de importación y exportación de llantas usadas desde y hacia múltiples países de América, Asia y Europa. Reiter finaliza como ya hizo en la revisión de 1987 con una visión negativa en la que el aumento del comercio internacional y la red de rutas comerciales provocará la introducción de más especies invasoras y la aparición o reemergencia de enfermedades, y muestra el ejemplo de Italia donde *Aedes albopictus* no ha llegado desde su origen asiático sino de Estados Unidos convirtiéndose así las distintas regiones del planeta tanto en importadores como exportadores de vectores y patógenos.

Yeç (2008) realizó una revisión de todos los trabajos publicados en los Estados Unidos de América desde 1930 sobre llantas usadas y mosquitos que se crían en ellas. El autor reportó la presencia de *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus* y propuso que *Aedes albopictus* es más abundante en llantas en el sur del país.

El transporte marítimo no es la única vía por la que estas y otras especies de mosquito pueden alcanzar nuevos territorios. Se ha constatado en múltiples ocasiones que el transporte aéreo puede también ayudar a la dispersión de vectores. En 1963 *Aedes vexans noctuinus* fue introducido en Hawái probablemente por medio de transporte aéreo (Joyce & Nakagawa 1963). En 1968 Pippin y colaboradores describieron como

varias larvas vivas de *Aedes aegypti* y *Culex cinereellus* habian sido encontradas en un avion que aterrizo en Kansas Estados Unidos procedente de Africa Occidental Goh & Kumatapathy 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 pequena 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 Milici & 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 Panamá

2.3 Materiales y métodos

2.3.1 Recolección de mosquitos con ovitrampas

Las recolecciones 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 Panamá. Previo a este muestreo, durante los años 2015 y 2016 se realizó una exhaustiva campaña de geo-referenciación de talleres por todo el país que culminó con 299 talleres relacionados con la compra y venta de llantas usadas (Fig. 10).

El muestreo mediante ovitrampas tuvo como propósito principal recolectar huevos de *Aedes* para el análisis taxonómico mediante la técnica de espectrometría de masas por MALDI-TOF-MS correspondiente a otro proyecto no recogido en este trabajo. Las ovitrampas (o trampas de oviposición) consistían en un recipiente negro pequeño en forma de cubo de no más de 500 cc, lleno hasta la mitad con agua del grifo. En el agua se sumergía parcialmente una paleta de madera semejante a un depresor lingual que actuaba como sustrato para la oviposición (Fig. S4).

Con el consentimiento del propietario o propietaria, en cada taller se desplegaron tres ovitrampas distanciadas entre sí y por un periodo de siete días 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 otro. Esto se hizo ante la posibilidad de que algunos huevos hubiesen eclosionado antes de la recolección, lo que permitía obtener información sobre las especies presentes mediante

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

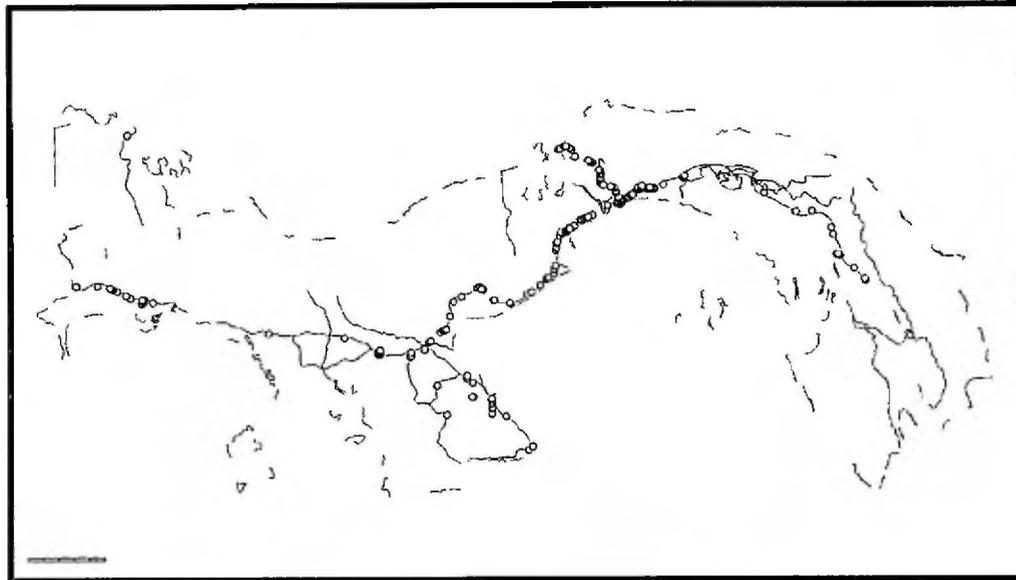


Figura 10 Total de talleres de compra y venta de llantas usadas georreferenciados durante los años 2015 y 2016 (N = 299)

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 excepcion 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 taller (Fig. S8) y tras secarse las paletas fueron conservadas a 20°C

2.3.3 Análisis de co-ocurrencia

Se usaron modelos probabilísticos 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-ocurieran a una frecuencia menor (P_{lt}) o mayor (P_{gt}) que la frecuencia de co-ocurrencia observada en los sitios de cría si las dos especies se distribuyeran independientemente una de la otra. Si $P_{lt} < 0.05$ dos especies tienen una co-ocurrencia negativa y si $P_{gt} < 0.05$ hay una co-ocurrencia 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 búsqueda activa. De estos 57 fueron muestreados únicamente mediante ovitrampas, 15 por búsqueda activa y 29 por ambos métodos. 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 explicó en la metodología, las ovipositorias se retiraron del agua antes de la eclosión para utilizar los huevos en un proyecto paralelo no incluido en esta disertación. La información a nivel de especie obtenida de las ovitrampas se corresponde a aquellos huevos que eclosionaron previo a la recuperación de las trampas. Así, de los 67 talleres en los que se encontraron ovipositorias, 50 contenían larvas y por tanto se pudo obtener información a nivel de especie.

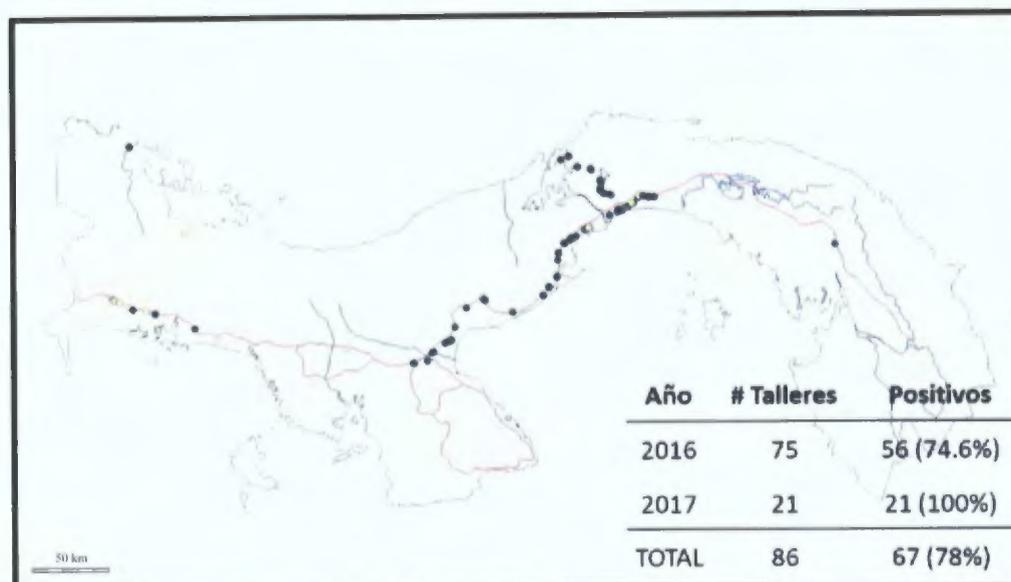


Figura 11. Talleres positivos para huevos de *Aedes*. Verde: Positivo; Blanco: Negativo

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.

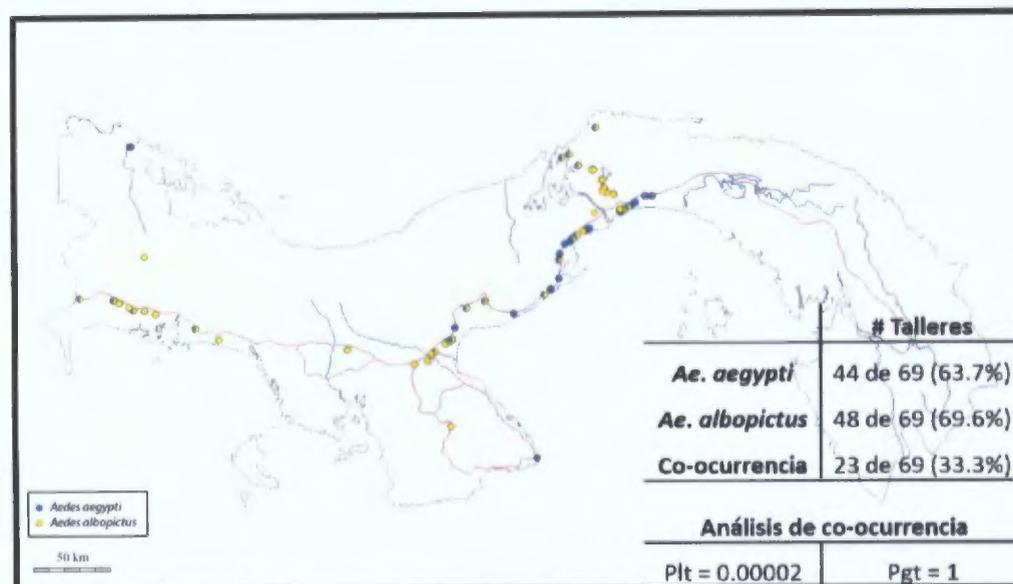


Figura 12. Presencia de *Aedes aegypti* y/o *Aedes albopictus* en ovitrampas y sitios de cría de talleres de compra y venta de llantas usadas.

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 Discussion

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

3.1.1 Variables físico químicas del hábitat larval

Los resultados indican que *Aedes aegypti* puede criarse indistintamente en todo el rango de temperatura muestreado mientras que *Aedes albopictus* preferiría valores menores dentro del intervalo. Estos resultados concuerdan con la literatura disponible donde se estima una temperatura umbral mínima para *Aedes albopictus* más baja que para *Aedes aegypti* (Tsuda & Takagi 2001). Así mismo, la distribución latitudinal actual de ambas especies sugiere que *Aedes albopictus* es capaz de soportar temperaturas más bajas que *Aedes aegypti* ya que el primero invade regiones templadas del globo donde el segundo no está presente actualmente (Kraemer *et al.* 2015). *Aedes aegypti* es por el momento incapaz de alcanzar latitudes templadas donde la variación anual de temperatura es más acusada que en las regiones tropicales donde se mantiene relativamente alta a lo largo del año. El intervalo de temperatura estudiado representa en gran medida las temperaturas encontradas en todo el territorio panameño a excepción 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 país a excepción 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 protozoos 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 más abundantes encontrados fueron *Proteobacteria*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria* y *Firmicutes*. Estos resultados son similares a los obtenidos en otros estudios de análisis de la composición microbiana relacionada con mosquitos, donde estos mismos grupos fueron también los más prevalentes (Duguma 2013, Gimonneau *et al* 2014, Coon *et al* 2016).

Si bien la composición en términos de OTUs es muy similar en ambas especies, y que comparten la mayoría de los taxa encontrados, la abundancia relativa de estos difiere entre *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus*. La proporción de *Xanthobacter* es muy superior en *Aedes albopictus* en comparación con *Aedes aegypti*. Sin embargo, la abundancia relativa de este género no es homogénea dentro de todas las muestras analizadas. La mayor influencia en la proporción de *Xanthobacter* en *Aedes albopictus* viene de un mismo sitio de cría en Tonosí, en la provincia de Los Santos, mientras que en el resto de sitios mantiene una proporción relativamente baja. Ocurre lo mismo con *Comamonadaceae*, muy abundante en un criadero de El Cacao, también en Los Santos, pero menos abundante en la mayoría 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 cría, 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 composición 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 es que dentro de lo

esperado teniendo en cuenta que los adultos analizados fueron sacrificados poco después de emerger sin permitirles alimentarse de sangre o azúcares lo cual sí dispara un cambio en la diversidad microbiana tal como vieron Wang y colaboradores (2011) en *Anopheles gambiae*

Las llantas usadas y los tanques de agua parecen ser los habitats más diversos en microbiota. No obstante, fueron también 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 logró acumular toda la diversidad existente en sitios de cría similares. Estos resultados, mostrando una diferencia significativa en la diversidad entre tipos de habitats, difiere de los encontrados por Ponnusamy y colaboradores (2008) que no vieron diferencias entre los tipos de contenedores que muestrearon (llantas, urnas de cementerio y otros recipientes artificiales 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. Krufman 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 podría llevar a diferenciar la composición de habitats similares antes de la infestación por larvas.

Los sitios de cría encontrados en residencias familiares fueron más ricos en términos de diversidad microbiana. No obstante, esta aparente mayor diversidad puede estar enmascarada debido a un mayor esfuerzo de muestreo en residencias con respecto a talleres, así como a la mayor variedad de habitats muestreados en residencias (contenedores plásticos, materia vegetal, objetos variados) en comparación a los muestreados en talleres que fueron en su inmensa mayoría llantas usadas, las cuales no varían significativamente unas de otras, a excepción de los diferentes tamaños que pueden encontrarse.

En cuanto a la temperatura y el pH tuvieron muy poca o ninguna influencia en la composición de la comunidad microbiana encontrada y solo algunos OGU's parecen ligeramente correlacionados con la variación térmica. El nulo efecto del pH sobre la comunidad microbiana difiere de lo encontrado por Lindström (2000) que definió el pH como una de las variables ambientales relacionadas con la composición 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 apoyaría los resultados obtenidos que los taxa encontrados se distribuyen independientemente del pH. Además 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 correspondía al ambiental sino al pH en el interior de los especímenes.

Es interesante ver que en los adultos de *Aedes aegypti* dos de los taxa más abundantes fueron una Lnterobacteriaceae y *Scrratia* las cuales contribuyen a la hemólisis y facilitan la digestión sanguínea (De o Gaio *et al.* 2011) mientras que en larvas estos taxa fueron escasos. *Scrratia* es además un género 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 *Scrratia odorifica* aumenta la susceptibilidad de *Aedes acgypti* a la cepa 2 del virus del dengue (Apte Desphande *et al.* 2012). Por otro lado parece que *Scrratia marcescens* puede inhibir el desarrollo de *Plasmodium* en *Anopheles* (Brando *et al.* 2013). Esta misma especie parece capaz de producir una prodigiosina con efecto larvicida contra *Aedes acgypti* y *Anopheles stephensi* (Patil *et al.* 2011). *Scrratia* es así un grupo de bacterias de especial interés ya que algunas de sus especies podrían ser utilizadas como agentes para el control de mosquitos o de los propios patógenos que estos transmiten.

La bacteria endoparasita *Wolbachia* apareció en ambas especies tanto en residencias como en talleres. Este trabajo es la segunda ocasión en que *Aedes aegypti* se encuentra infectado por *Wolbachia* de forma natural. Coon y colaboradores la encontraron en algunos especímenes de esta especie en Florida en 2016, aunque no le dieron mayor importancia al ser un hallazgo secundario en su trabajo, y tal es así que la comunidad científica aún considera *Aedes aegypti* libre de infección por *Wolbachia* de forma natural (Pan *et al.* 2017). Nosotros no solo encontramos *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus* infectados con *Wolbachia*, sino que se encontró en múltiples puntos a lo largo del país e incluso en ciudades donde co-ocurrieron ambas especies. La infección 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 especímenes de *Aedes albopictus* analizados estuvo dominada por *Wolbachia*, o el trabajo de Joanne y otros investigadores (2017) en Malasia, donde afirman que más del 90% de la población de *Aedes albopictus* presenta una superinfección con *Wolbachia*. Los bajos niveles de infección por *Wolbachia* en *Aedes albopictus* en Panamá podría deberse tal vez a un reciente contacto de la bacteria con el mosquito, el cual se encontraría actualmente en proceso de invasión. De cualquier manera, estos niveles de infección bajos podrían ser una oportunidad excelente para poner a prueba experimentos de liberación de mosquitos con cepas más efectivas como wMel, ya que al no encontrarse otras cepas en el grueso de la población no entraría en conflicto y las posibilidades de éxito serían mayores.

3.1.3 *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus* en talleres de llantas usadas

Los mosquitos del género *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 podría encontrarse subestimado debido a que la semana de muestreo en la provincia de Chiriquí de donde provienen la mayoría de los talleres negativos coincidió con el paso del huracán Otto cerca de la costa atlántica de Panamá que dejó fuertes y continuas lluvias que pudieron impedir a las hembras volar y ovipositar. De no haber sido por esta variable climática la ocurrencia de *Aedes* en 2016 habría 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 país es decir un tercio del total el resultado puede considerarse representativo de la situación actual en Panamá. Muchos de los talleres muestreados se encuentran alejados por kilómetros del núcleo poblacional más cercano y sin embargo se encuentran 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 están rodeados por territorios inhabitados es difícilmente explicable por mecanismos de dispersión naturales. Esta alta prevalencia en los talleres podría facilitar el transporte de ambas especies en llantas. Varios estudios ya han considerado la dispersión 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 dispersión de *Aedes albopictus* o más recientemente Medlock y otros investigadores (2017) que informan de la expansión de

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

Los resultados obtenidos apoyan el modelo descrito por Miller & Loaiza (2015) donde propusieron la red de carreteras de Panamá como el modelo que mejor explica la rápida expansión de *Aedes albopictus*. Su modelo predictivo además acertó en la expansión de la población de *Aedes albopictus* hacia la península de Azuero, la región pacífica de la provincia de Coclé e incluso la provincia de Darién, en la que *Aedes albopictus* estaba ausente en 2016, y sin embargo se encontró ampliamente distribuido en la localidad de Metetí durante muestreos realizados en 2017.

Aunque *Aedes albopictus* fue encontrada en más talleres que *Aedes aegypti* (48 versus 44, respectivamente, de los 69 muestreados con información a nivel de especie), la diferencia no es suficiente como para sacar conclusiones sobre qué especie es más eficaz en el uso de llantas usadas como vehículo para su dispersión. La heterogeneidad que se visualiza en su distribución geográfica, así como el patrón de exclusión que arroja los resultados del análisis de coocurrencia, parece indicar que la predominancia de una especie en un territorio con respecto a la otra está condicionada por otros factores más allá de su efectividad para criarse y viajar en llantas. Estos resultados apoyan la teoría de la competencia dependiente de las condiciones ambientales, según la cual las ventajas de una especie sobre la otra dependen de las condiciones del hábitat (Costanzo *et al.* 2005). Así mismo, sugiere que un posible proceso de exclusión competitiva está ocurriendo actualmente en Panamá, 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 típicos en regiones tropicales como Panamá. Su distribución no obstante parece regirse por otros factores más allá de las condiciones del hábitat larval y probablemente tengan más que ver con variables que afecten también a los adultos como pluviosidad, humedad relativa o fuentes de sangre. Un estudio más detallado que incluya estas y otras variables en Panamá sería valioso para tal vez prever la expansión de estas especies y posibles brotes de enfermedades.

La rica diversidad microbiana encontrada en los especímenes recolectados en sitios de cría 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 órganos provocando distintos efectos en los individuos que las portan. No obstante, el papel que juega la mayoría de la microbiota encontrada habitualmente en estas especies es aún desconocido y aunque posiblemente muchas de ellas no tengan ningún efecto directo sobre el mosquito, podrían interactuar con patógenos aumentando o disminuyendo la capacidad vectorial o interferir en la aplicación de métodos de control como la introducción de *Wolbachia* en una población a tratar.

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

con la cepa wMel que se están llevando a cabo en algunas partes del mundo. La presencia de cepas de *Wolbachia* en poblaciones salvajes de *Aedes aegypti* podría hacer fracasar este método ante la interacción negativa de distintas cepas. Varias preguntas surgen de este hallazgo. ¿Llegó *Wolbachia* con *Aedes albopictus* cuando este invadió Panamá? ¿Es la infección por *Wolbachia* de *Aedes aegypti* fruto de su interacción con *Aedes albopictus* o presentan cepas diferentes? ¿Influyen esta cepa o cepas en el desarrollo y éxito reproductivo de los especímenes infectados? Dado que no se ha encontrado *Wolbachia* en las regiones del país donde solo se encuentra *Aedes aegypti* cabría pensar que la infección de esta especie podría tener su origen en la interacción interespecífica bien sea por su co-ocurrencia en lugares de cría o por intentos de copula interespecíficos donde la bacteria puede ser transmitida sexualmente. Por esclarecer esto sería conveniente la secuenciación genómica 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 albopictus* y por ende para la salud pública. Si bien debido a la naturaleza del muestreo y los datos recogidos, este trabajo no demuestra que estas especies estén utilizando las carreteras sirviéndose del transporte de llantas usadas para su dispersión, sí aporta datos empíricos sobre la infestación de los talleres que comercian con estas llantas a lo largo y ancho del país tanto en localidades como en sitios remotos con escasa densidad poblacional. El paso siguiente para corroborar este método de dispersión sería el muestreo activo de vehículos transportando llantas en la carretera. Por ejemplo, serviría de los puestos de control de vehículos localizados en la

carretera interamericana para examinar las llantas que se transportan en busca de estadios inmaduros. Así mismo, un análisis de flujo genético en talleres y residencias podría ayudar a esclarecer si esta ruta de dispersión de verdad es habitual, caso en el cual las tasas de flujo genético serían mayores a lo largo de la carretera que entre localidades alejadas de esta. Sería interesante también conocer la cepa o cepas de *Wolbachia* presentes en los talleres de compra y venta de llantas usadas, ya que, de ser la misma, podría ser una prueba del desplazamiento de los mosquitos a través de las carreteras.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

APTE DESHPANDE A PAINCANKAR, M GOKHALE M D, & DEO BAGKAR, D N 2012 *Scitatia 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 *Scitatia maculipennis* 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, & HIGGS 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) 157 165

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, MOHAMMED A PEREZ, S POWELL 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* Meigs 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 *Acijm* 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) 559-578

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., TURNBAUGH, 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 euhaline 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 *Memórias 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, VOUREC H, G & FONTFNIILLE, 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. *EME* 14(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 JONFS 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) 3055-3047

FWING 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 Tripartite interactions between tsetse flies *Sodalis glossinidius* and trypanosomes—in 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 AMBFNE 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 IALALI S K, & PUTTARAJU, H P 2014 *Wolbachia* a foe for mosquitoes *Asian Pacific journal of tropical disease* 4(1) 78 81

HAMMER Ø HARPFER 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 COSTFRO, 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 ORMAETXE, 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) e31115

HONORIO N A SILVA W D C , LFITE 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, VYTHILINCAM, 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 arboviral vectors *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* *PLoS One* 10:e01347

KRAMFR 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 rate 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 Paraíba 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

MEDFIROS M C BOOTHE F 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

OMEARA 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 *Streptomyces 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 cinereellus* 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. Survecon* 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 tubidium 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 identificación de larvas de mosquitos de interés sanitario encontradas en criaderos artificiales en la Argentina *Buenos Aires: Fundación 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

SPRENGER D AND T WUITHIRANYAGOOOL 1986 The discovery and distribution of *Aedes albopictus* in Harris County Texas J Am Mosq Control Assoc 2 217-219

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* 43(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 *Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana* 94(5) 473-481

VERDONSCHOT, P F & BESSE LOTOTSKAYA, A A 2014 Flight distance of mosquitoes (Culicidae): a meta-data analysis to support the management of barrier zones around rewetted and newly constructed wetlands *Limnological Ecology and Management of Inland Waters* 43 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) 581-595

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) 526-528

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

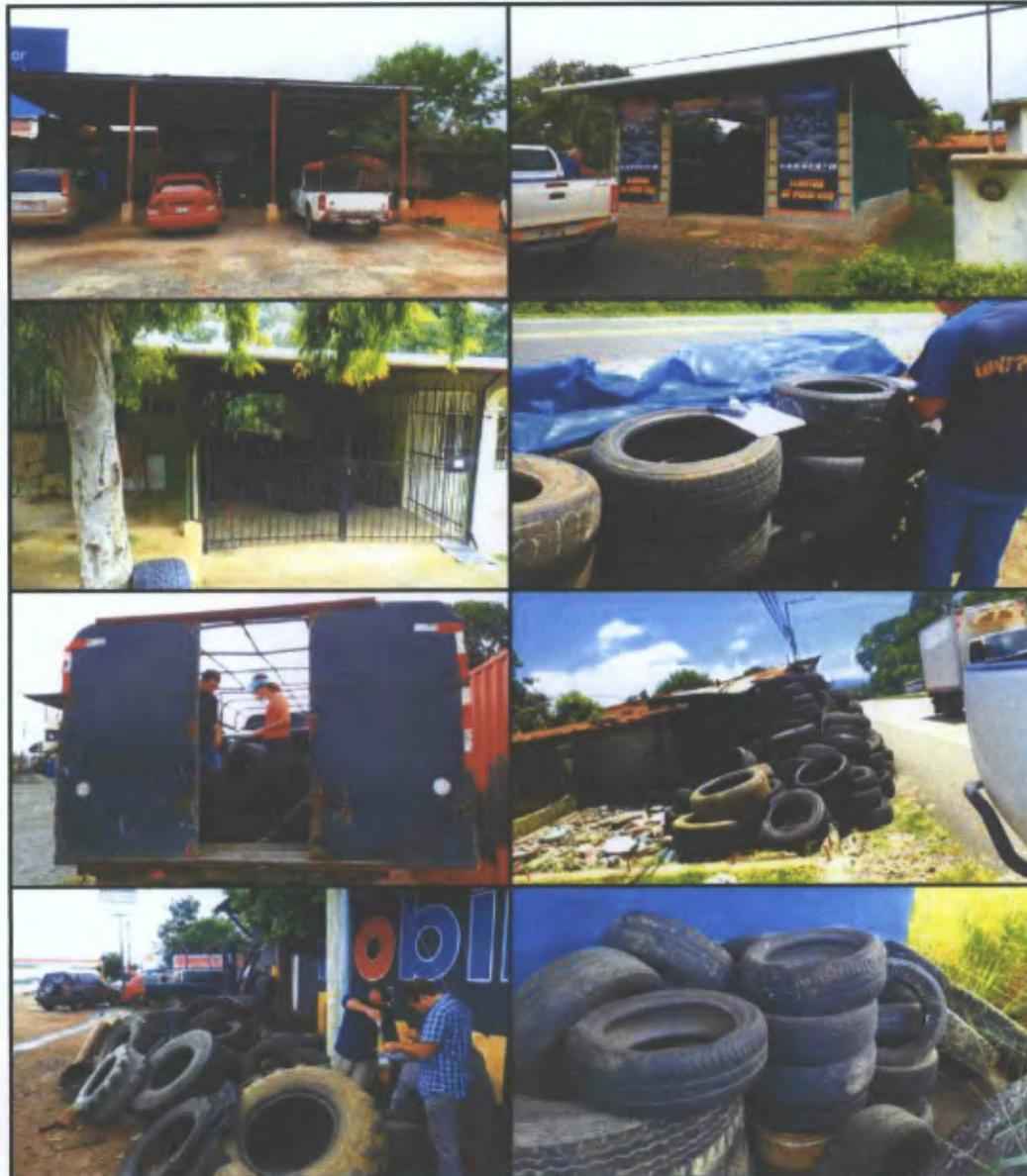


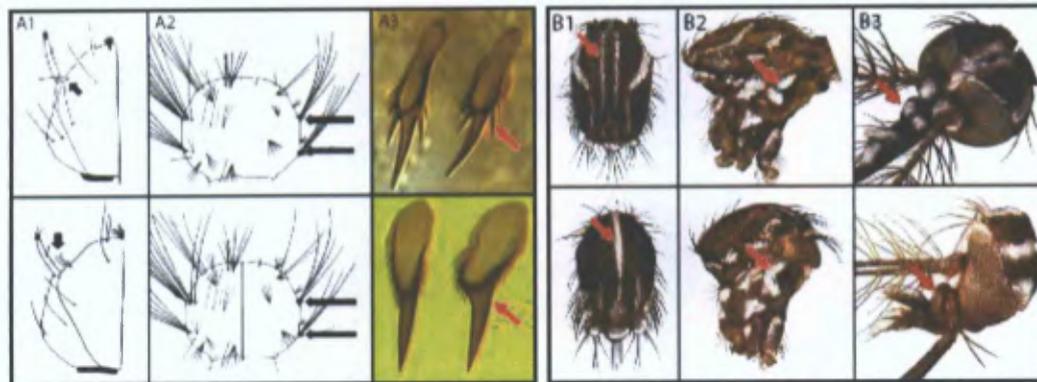
Figura S4. Metodología de recolecta y manejo de muestras



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: Ovitrapa utilizada 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 caudal. B1: Patrón de líneas longitudinales en el notum; B2: Mancha pleural en forma de coma; B3: Escamas blancas en el clipeus;

Figura S6 Histogramas de distribución de las medidas de Temperatura y pH de los sitios de cría

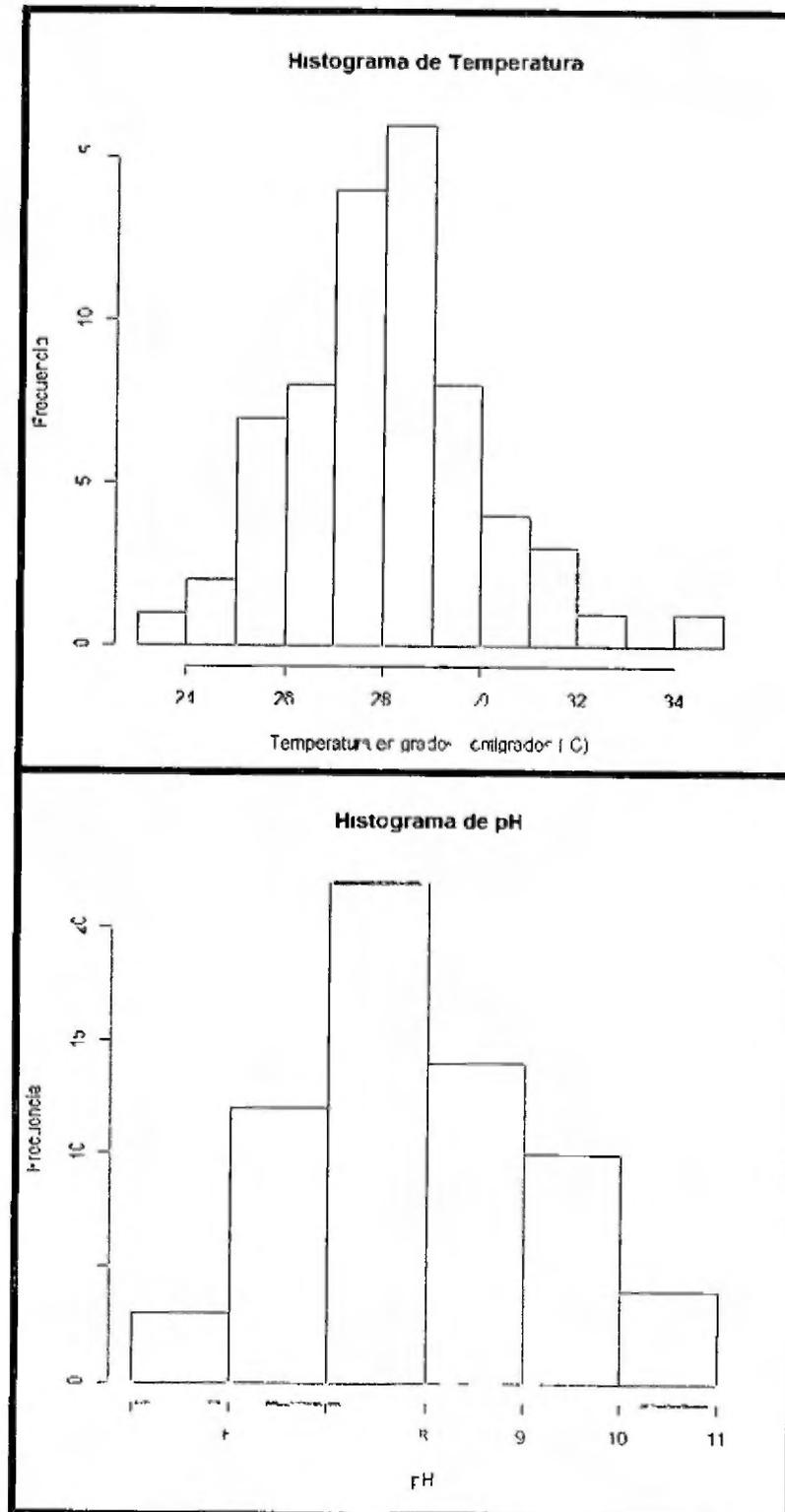


Figura S7 Grafica de correlacion de Temperatura y pH

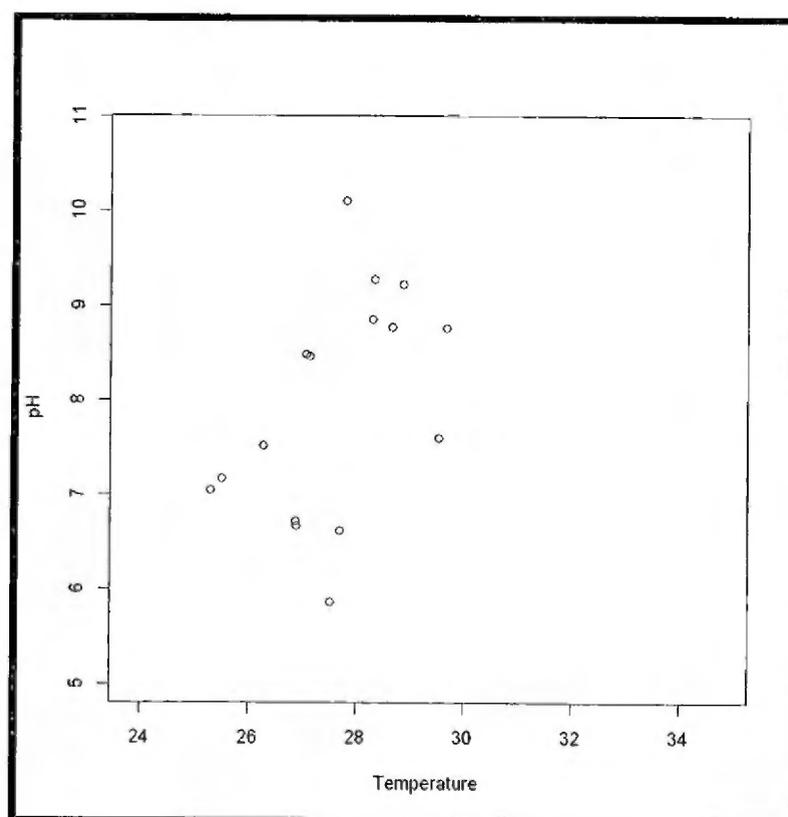
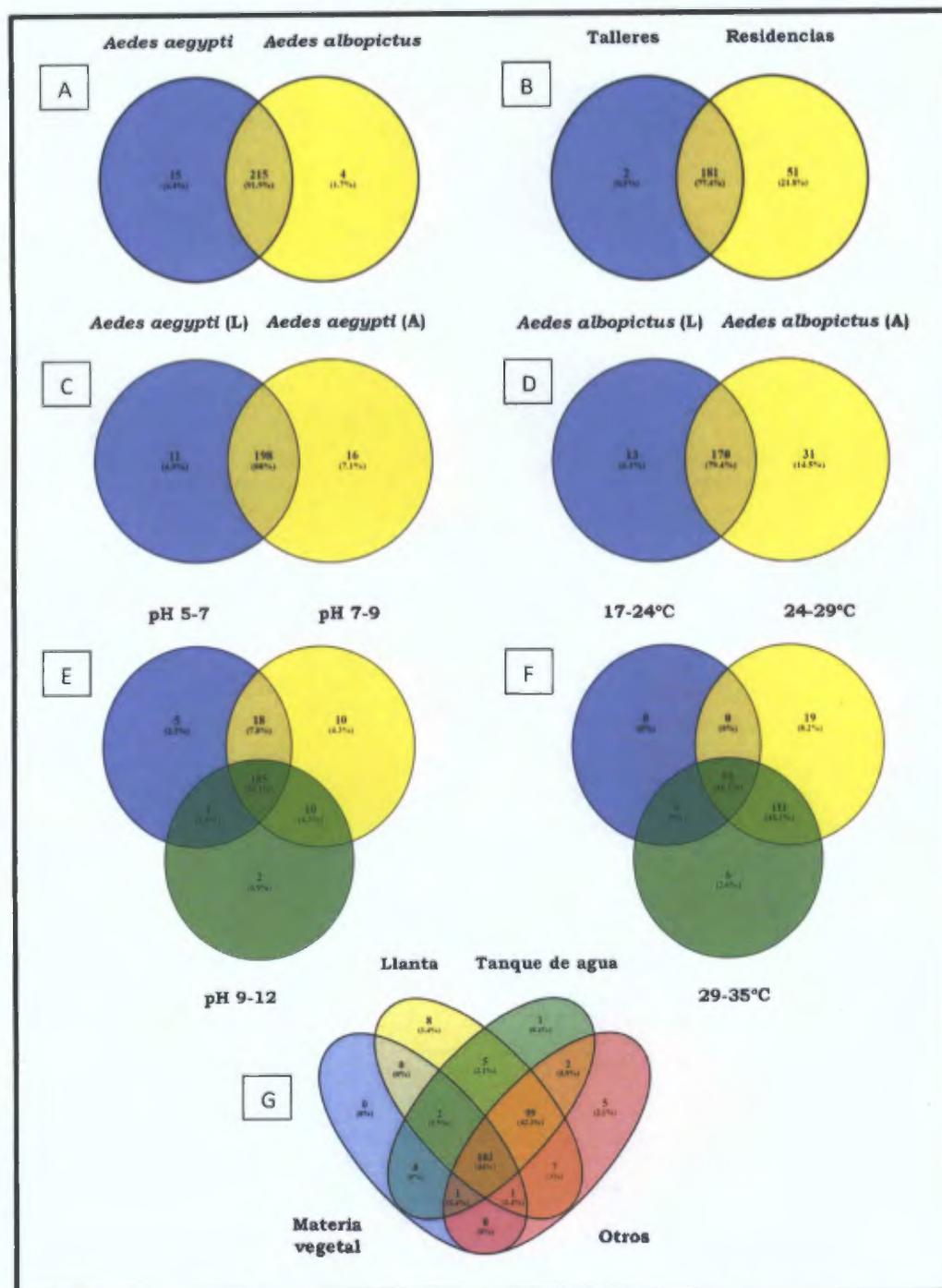


Figura S8. Distribución de las OTUs encontradas en distintas categorías



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*

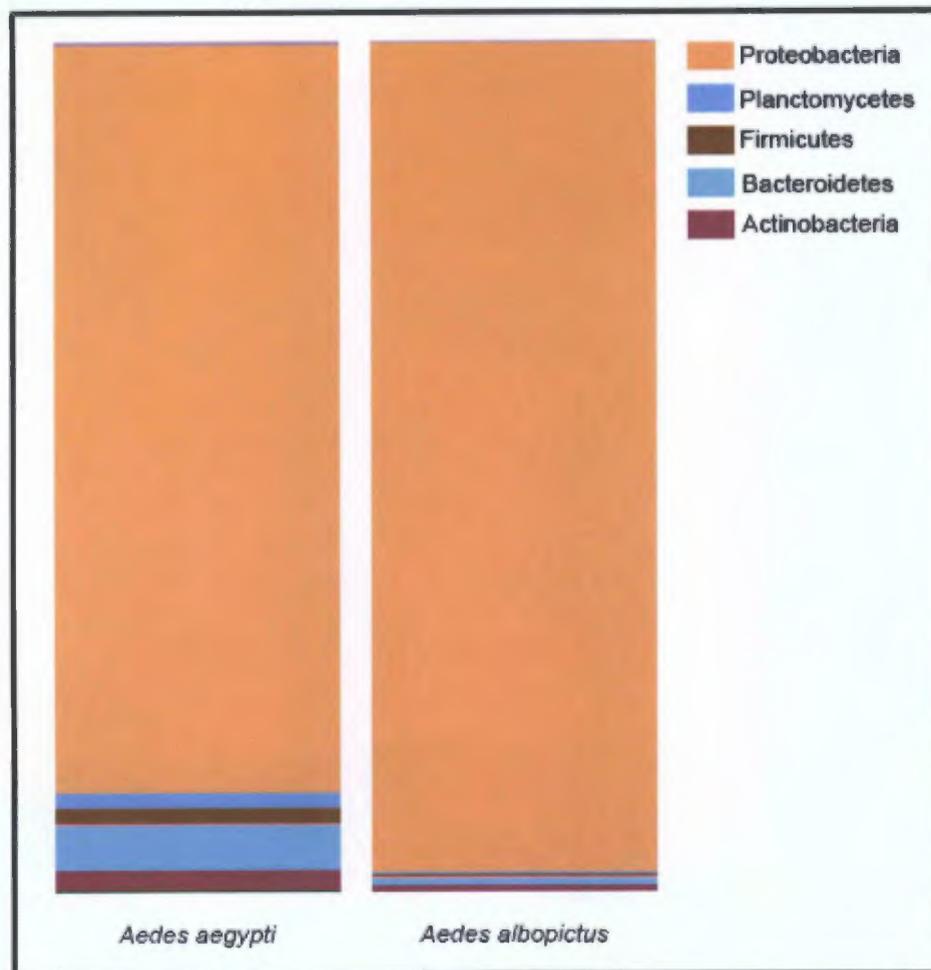


Figura S10. Postura de huevos del género *Aedes* encontrada en ovitrampa



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
<i>Aedes aegypti</i>	14 38	30	14	36	Bar Zeev 1958
	10 40	35	na	40	Tun Lin <i>et al</i> 2000
	na	na	8 5	na	Tsuda & Takagi 2001
	16 39	22 32	na	39	Marinho <i>et al</i> 2016
<i>Ae albopictus</i>	na	na	5 3	na	Tsuda & Takagi 2001
	5 40	29 7	10 4	40	Delatte <i>et al</i> 2009
<i>Ae nigromaculis</i>	21 32	21 26 5	11	35	Brust 1967
<i>Ae sollicitans</i>	12 35	30	12	na	Shelton 1973
<i>Ae sticticus</i>	5 34	na	6	33	Trips <i>et al</i> 1973
<i>Ae triseriatus</i>	12 35	26	na	35	Shelton 1973
<i>Ae vexans</i>	21 32	26 5 32	9	38	Brust 1967
<i>Anopheles albimanus</i>	12 35	26	15	35	Shelton 1973
<i>An gambiae</i>	24 30	27	na	na	Lymo <i>et al</i> 1992
	10 40	30 32	18	34	Bayoh & Lindsay 2003
<i>An quadrimaculatus</i>	10 35	31	7	35	Huffaker 1944
	12 35	24	15	32	Shelton 1973
<i>Culex pipiens</i>	20 40	30	na	35	Kramer 1915
<i>Cx quinquefasciatus</i>	12 35	23 26	na	35	Shelton 1973
	15 34	20 27	na	na	Rueda <i>et al</i> 1990
<i>Cx restuans</i>	12 35	29	na	32	Shelton 1973
<i>Cx salinarius</i>	12 35	23	na	35	Shelton 1973
<i>Culiseta inornata</i>	21 32	20 22	6	29	Brust 1967
	12 35	26	12	29	Shelton 1973
<i>Psorophora columbiae</i>	16 39	28 34	na	39	McHugh & Olson 1982
<i>Toxorhynchites brevipalpis</i>	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
<i>Aedes aegypti</i>	MacGregor 1929 Buddington 1940 Clark 2004 Bhami et al 2015 Bazo et al 2017
<i>Aedes albopictus</i>	Senior White 1925 Gubler 1971 Bhami et al 2015 Bazo et al 2017
<i>Aedes caspius</i>	Salit et al 1996
<i>Aedes polynesiensis</i>	Gubler 1971
<i>Aedes scutellaris</i>	Penn 1947
<i>Aedes taeniorhynchus</i>	Clark 2004
<i>Anopheles crucians</i>	Barber & Komp 1922
<i>Anopheles culicifacies</i>	Russell & Ramachandra 1942
<i>Anopheles maculipes</i>	Beklemishev & Mitrofanova 1926
<i>Anopheles punctipennis</i>	Barber & Komp 1922
<i>Anopheles quadrimaculatus</i>	Barber & Komp 1922
<i>Anopheles spp</i>	Salit et al 1996
<i>Culex pipiens</i>	Buddington 1940 Salit et al 1996
<i>Culex pusillus</i>	Salit et al 1996
<i>Culex quinquefasciatus</i>	Bazo et al 2017
<i>Culex restuans</i>	Bazo et al 2017
<i>Culiseta spp</i>	Salit et al 1996

**Cuadro S3 Sitios de cria hallados en residencias de
localidades de Panama durante 2016 y 2017**

BT Bocas del Toro CH Chiriquí CI Cidre CN Colon DA Darién IS Isla Soberanía PA Panamá VE Veraguas

Provincia	Localidad	Material	Latitud	Longitud	Γ	pH	Ano	Ae aegypti	Ae albopictus
BI	Almirante	plastic	9 291275	82 401916	30 83	7 34	2017	1	0
BT	Almirante	plastic	9 291275	82 401916	29 77	7 25	2017	1	0
BI	Changuinola	ceramic	9 450213	82 523755	28 37	7 03	2017	1	0
BT	Changuinola	rubber	9 450990	82 524320	29 60	9 28	2016	1	0
BT	Changuinola	rubber	9 450990	82 524320	28 67	9 34	2016	1	0
BI	Changuinola	organic	9 454555	82 516475	29 37	6 83	2017	1	0
BI	Changuinola	rubber	9 476051	82 507743	26 33	7 43	2017	1	0
BI	Changuinola	rubber	9 476081	82 507743	25 87	7 63	2017	1	0
BT	Changuinola	rubber	9 477573	82 508068	26 97	7 71	2017	1	0
BT	Changuinola	metal	9 477641	82 510542	25 93	7 55	2017	1	0
BT	Chiriqu Grande	rubber	8 943543	82 11308	30 63	6 95	2017	1	0
BI	Chiriqu Grande	glass fiber	8 944469	82 114122	29 73	7 25	2017	1	0
BI	Chiriqu Grande	plastic	8 944489	82 114122	30 43	7 46	2017	1	0
BI	Chiriqu Grande	plastic	8 951492	82 120356	30 33	6 01	2017	1	0
BI	Chiriqu Grande	rubber	8 944450	82 114100	26 10	9 43	2016	1	0
BI	Chiriqu Grande	metal	8 946290	82 118960	28 33	9 28	2016	1	0
BT	Chiriqu Grande	plastic	8 946290	82 118960	30 10	9 32	2016	1	0
BT	Isla Colon	rubber	9 339490	82 243110	27 07	8 49	2016	1	0
BT	Isla Colon	plastic	9 341730	82 242850	27 13	8 47	2016	1	0
BI	Isla Colon	plastic	9 344080	82 251680	25 73	9 31	2016	1	0
BT	Isla Colon	plastic	9 344660	82 251820	25 47	8 93	2016	1	0
BI	Isla Colon	plastic	9 346360	82 253110	25 27	9 41	2016	1	0
BI	Isla Colon	rubber	9 357820	82 252900	27 13	8 12	2016	1	0
BI	Isla Colon	rubber	9 362620	82 239350	26 27	8 17	2016	1	0
CI	Divi Divi	plastic	8 415737	82 427232	33 27	8 57	2017	0	1
CI	Divi Divi	rubber	8 421805	82 425909	25 20	10 43	2016	1	0
CI	Calca	N/A	8 525675	82 298607	31 37	7 70	2017	0	1
CI	Calca	tap	8 526749	82 298073	29 53	7 83	2017	0	1
CH	Gualaca	plastic	8 528255	82 297362	29 50	8 18	2017	0	1
CI	Gualaca	plastic	8 528276	82 297427	27 50	8 01	2017	0	1
CI	Gualaca	rubber	8 528701	82 297844	27 23	10 18	2016	0	1
CI	Gualaca	organic	8 533181	82 297747	NaN	NaN	2017	0	1
CI	Gualaca	plastic	8 536745	82 298271	27 00	7 54	2017	0	1
CI	Ilce	rubber	8 613040	80 562340	24 97	8 18	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
CN	Portobelo	tap	9 554440	79 653000	26 46	8 69	2016	1	0

Prov nca	Local dad	M t r al	L t tud	I ong tud	Γ	pH	Ano	Ae egypt	A albop ctus
CN	Sib tns	lbc	9350910	79796620	2887	923	2017	1	0
CN	Sabanins	ulb	9350930	79796660	2817	878	2017	1	0
DA	Metet	plstc	8491371	77982617	2870	1027	2017	1	1
DA	Metet	plstc	8495037	77981407	2840	1037	2017	1	1
DA	Metet	rubber	8495840	77982696	NAN	NAN	2017	1	1
DA	Metet	rubber	8499740	77976960	3003	1056	2017	1	1
DA	Meteti	plstic	8512656	77978220	2607	1203	2017	0	1
LS	Cacao	rubber	7448333	80406388	NAN	NAN	2017	0	1
LS	ElCacao	plstc	7447889	80404333	2957	551	2016	0	1
LS	ElCacao	trp	7448389	80403600	3263	740	2016	0	1
LS	ElCacao	rubber	7448389	80403600	2880	757	2016	0	1
LS	ElCacao	plstc	7448639	80406194	2773	709	2016	0	1
LS	ElCacao	rubber	7448703	80406194	2927	757	2016	0	1
LS	ElCacao	trp	7448722	80406222	2800	701	2016	0	1
LS	ElCacao	trp	7448778	80406194	2897	721	2016	0	1
LS	LaVilla	trp	7931556	80409944	2963	740	2016	1	1
LS	LaVilla	plstc	7931666	80417500	NAN	NAN	2017	1	0
LS	LaVilla	plstc	7932361	80419250	2817	665	2016	1	1
LS	LaVilla	plstc	7932806	80415111	3023	669	2016	1	0
LS	LaVilla	plstic	7932917	80415056	2953	760	2016	1	0
LS	LaVilla	plstic	7935639	80422167	2690	667	2016	1	1
LS	LaVilla	plstic	7935639	80422167	2843	687	2016	1	0
LS	LaVilla	plstc	7936361	80415778	2687	672	2016	1	0
LS	LaVilla	plstc	7941444	80411139	2710	646	2016	1	1
LS	Macaracas	organic	7727460	80551900	2753	597	2016	0	1
LS	Macaracas	ceramic	7729083	80551472	2743	767	2016	0	1
LS	Macaracas	plstc	7730083	80548333	2770	662	2016	0	1
LS	Macaraca	plstic	7730889	80546972	3127	773	2016	0	1
LS	Parilla		7728306	80176306	3107	665	2016	0	1
LS	Parilla	plstic	7628417	80177417	2842	744	2016	1	1
LS	Parilla	plstic	7631222	80174694	2903	746	2016	1	0
LS	Pedras	bbcr	7531666	80029444	NAN	NAN	2017	1	1
LS	Pedras	N/A	7530694	80025661	2770	777	2016	1	0
LS	Idasi	plstic	7532667	80029833	2627	752	2016	1	1
LS	Idasi	plstic	7532667	80029833	2577	760	2016	1	1
LS	Ionosi	rubber	7405277	80435833	NAN	NAN	2017	1	1
LS	Ionosi	rubber	7410833	80109166	NAN	NAN	2017	0	1
LS	Ionosi	ceramic	7404500	80441222	2530	705	2016	0	1
LS	Ionosi	plstic	7404556	80441306	3037	617	2016	0	1
LS	Ionosi	rubber	7404556	80441306	3003	741	2016	0	1
LS	Ionos	rubber	7405083	80443139	2824	625	2016	0	1
LS	Ionosi	netil	7405750	80440026	2686	717	2016	0	1
LS	Ionos	plstic	7405750	80440025	2550	717	2016	0	1
LS	Ionos	plst	7410444	80442889	2817	504	2016	0	1

Prov ncia	Localidad	Mater al	Lat tud	Long tud	T	pH	Ano	Ae aegypti	Ae albop ctus
PA	Chepo	rubber	9 161523	79 03247	31 87	6 76	2017	1	0
IA	Ch po	ubber	9 163473	79 035289	27 70	10 90	2017	1	1
IA	Ch l b e	ubbc	9 153230	79 615095	28 27	10 61	2016	0	1
PA	Ch l b e	ubbc	9 153290	79 618098	27 13	10 28	2016	0	1
IA	Ch l bre	ubber	9 153290	79 618098	27 93	10 44	2016	0	1
IA	Ch l b e	metal	9 173405	79 611128	27 80	10 11	2017	0	1
IA	Ch l b e	plastic	9 173405	79 611128	28 03	9 71	2017	0	1
PA	Ch l bre	plastic	9 173405	79 611128	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 Coclé 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	Concepcion	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 Viejo 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	Varital	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 búsqueda activa en Panama durante 2016 y 2017

BT Bocas del Toro CH Chiriquí CI Coclé CN Colón DA Darién IS Los Santos PA Panamá VF Veraguas Positivo 1 Negativo 0

Provincia	Metodo	Latitud	Longitud	Ano	Ovipostura	<i>Ae aegypti</i>	<i>Ae albopictus</i>
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	OI	9 145762	79 621817	2017	1	0	0
CN	OI	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	<i>Ae aegypti</i>	<i>Ae albopictus</i>
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
IS	BA	7 736419	80 279094	2016	NA	0	0
IS	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
IS	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	<i>Ae aegypti</i>	<i>Ae albopictus</i>
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
FA	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