



UNIVERSIDAD  
NACIONAL  
DE LA PLATA

  
Facultad de Ciencias  
**Naturales y Museo**

- TESIS DOCTORAL -

# ESTUDIO Y DETECCIÓN DE FLAVIVIRUS EN MOSQUITOS DE IMPORTANCIA SANITARIA

Tesista

***MSc. Melisa B. Bonica***

Lugar de trabajo

Centro de Estudios Parasitológicos y de Vectores  
(CEPAVE - UNLP - CONICET)

Directoras

***Dra. M. Victoria Micieli***

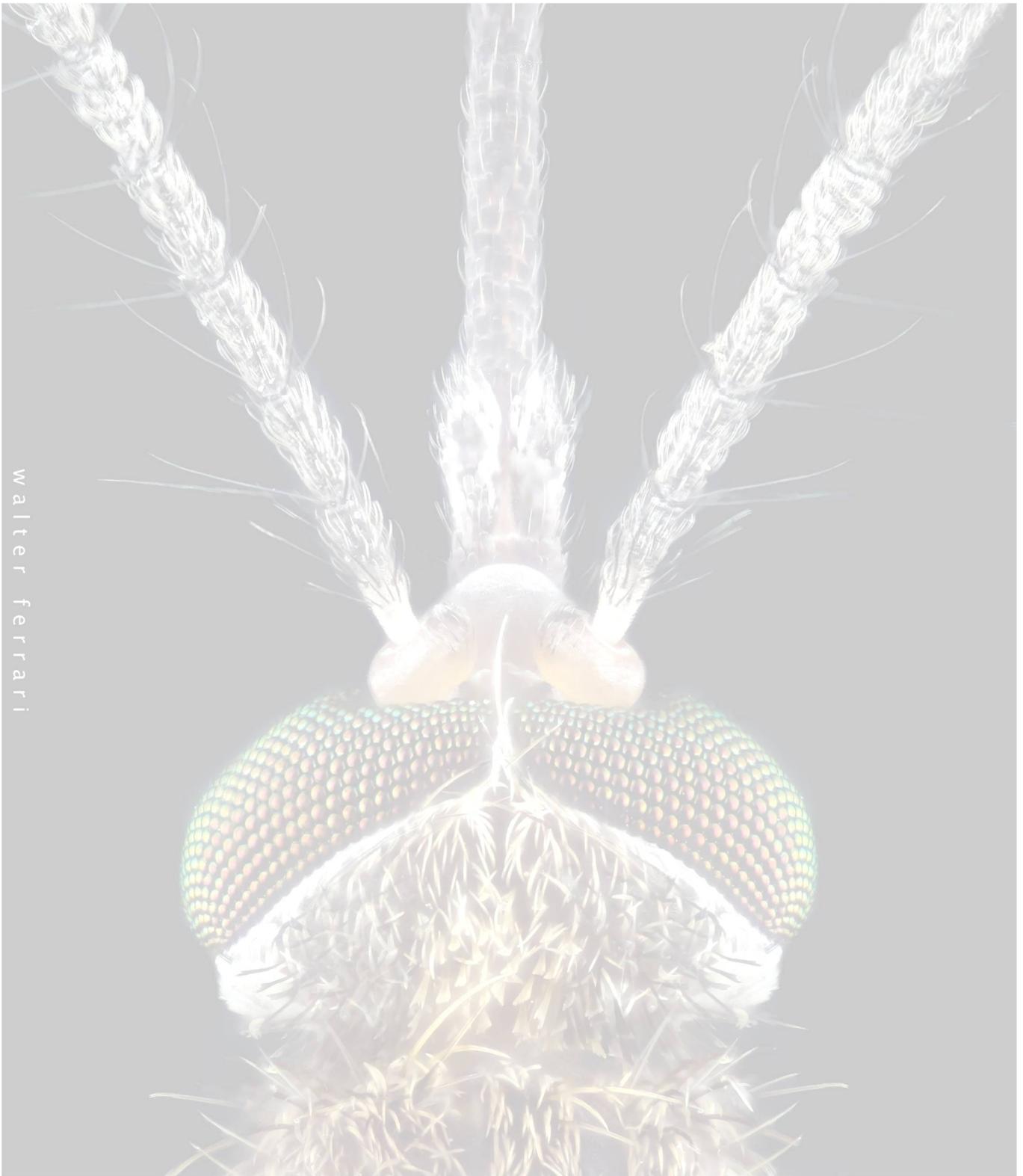
***Dra. Carolina Torres***

La Plata, 2022



UNIVERSIDAD  
NACIONAL  
DE LA PLATA

CEPAVE



walter ferrari

Foto de portada  
Walter Ferrari

*A mí misma,  
como recordatorio de que siempre puedo.*

*A mi familia,  
que es mi sostén y mi alegría.*

*"Él le llamó "aceptación" a ese llanto sin consuelo*

*Y desde ahí, transformó la rigidez del miedo*

*Cruel y paralizador, en impulso motor.*

*Él le llamó "plenitud" a esa risa en carcajada*

*Y desde ahí, la virtud de vivir libre o nada*

*Creció."*

Hasta acá nos ayudó Dios! – Las Pastillas del Abuelo

## AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero agradecerle a Victoria, por haber confiado en mí, por haberme dado la oportunidad de formar parte del CEPAVE, por la libertad que me concedió para trabajar en lo que me apasiona, y por todo lo aprendido en estos cinco años.

A Carolina, que apareció en este camino en un momento difícil, y que con su paciencia y tranquilidad siempre me dio la seguridad de que todo iba a salir bien.

A todo el personal de apoyo del CEPAVE, Graciela, Hernán, Laura... a los chicos de administración Mica, Migue y Gasti... y en especial a el Chino y el Rata, que además de ayudarme y participar activamente en este trayecto, se volvieron amigos.

A los chicos de hongos, Ale, Romi, Manu y Claudia. Por la buena onda, las charlas, compartir el almuerzo y los espacios. Siempre hay un lugarcito para uno más!

A los "Vinchusquitos", Eva, Agus, Gerardo por su compañía, las risas, por hacer todo más llevadero. Y a mis amigas... Sole, gracias por ser la hermana mayor, por compartir tu experiencia, por bajarme las revoluciones. Maru, por reírte de todo y dar alegría a las mañanas, por compartir el gusto por los resaltadores, el mundo mágico y los bizcochitos. Ailu, por ser mi Yin, mi compañera, por los pactos de silencio y por estar SIEMPRE! Los quiero, mucho!

A mi familia, toda. Por ayudarme desde siempre, con una mesa, una silla, una cortina para llenar un departamento vacío, por irme a visitar o recibirme en sus casas un fin de semana. Por cuidar a mi bebé cuando el deber llama. Por quererme tanto y dejarme quererlos tantos. A mi abuelita, que es mi estrella favorita y la extraño mucho. A mis padres, por lo que soy hoy, por incentivar me a estudiar y darme siempre lo mejor.

A mi hermana, por ser mi fiel compañera desde siempre. No hay distancia ni circunstancia que pueda entrometerse en el amor que nos une.

A mi papá y mi hermano, por enseñarme que nunca es tarde.

A Ejner y Alek, los hombres de mi vida. Con uno aprendí el significado de INCONDICIONAL, con el otro el significado de PARA SIEMPRE. Los amo, con todo mi corazón!

## ÍNDICE

---

<b>RESUMEN .....</b>	<b>8</b>
<b>SUMMARY .....</b>	<b>10</b>
<b>INTRODUCCIÓN GENERAL .....</b>	<b>12</b>
Arbovirus.....	12
El género Flavivirus.....	13
Mosquitos de importancia sanitaria.....	18
Interacción virus-mosquito .....	21
<b>OBJETIVOS E HIPÓTESIS.....</b>	<b>25</b>
Objetivos generales .....	25
Objetivos específicos .....	25
Hipótesis .....	25
<b>PARTE I. Búsqueda e identificación de flavivirus en mosquitos de interés sanitario ...</b>	<b>26</b>
I.1. Introducción.....	26
I.1.1. Flavivirus de importancia sanitaria .....	26
I.1.2. Flavivirus específicos de insectos .....	29
I.1.3. Transmisión viral.....	31
I.1.4. Integraciones virales en el genoma de los mosquitos .....	32
I.2. Materiales y métodos.....	34
I.2.1. Áreas de muestreo.....	34
I.2.2. Recolección e identificación de mosquitos .....	36
I.2.3. Detección de flavivirus y NIRVS .....	38
I.2.3.1. Extracción de ácidos nucleicos .....	38
I.2.3.2. Análisis del ARN .....	39
I.2.3.3. Análisis del ADN.....	40
I.2.4. Análisis filogenéticos y de divergencia.....	40

I.3. Resultados .....	42
I.4. Discusión.....	47
I.5. Conclusiones .....	50
<b>PARTE II. Competencia vectorial de <i>Aedes aegypti</i> para el virus Zika.....</b>	<b>52</b>
II.1. Introducción.....	52
II.1.1. Generalidades de ZIKV .....	52
II.1.2. Historia y epidemiología de ZIKV .....	52
II.1.3. Vías de transmisión del virus .....	54
II.1.4. Zika en Argentina .....	56
II.2. Materiales y métodos.....	58
II.2.1. Desarrollo de un alimentador artificial .....	58
II.2.2. Mosquitos y cepas virales.....	58
II.2.3. Infección oral .....	59
II.2.4. Procesamiento de los mosquitos .....	59
II.3. Resultados .....	61
II.4. Discusión.....	63
II.5. Conclusiones .....	66
<b>CONCLUSIONES GENERALES Y PERSPECTIVAS FUTURAS .....</b>	<b>68</b>
<b>ANEXO 1 – Casos notificados con sospecha de arbovirosis, 2018 .....</b>	<b>70</b>
<b>ANEXO 2 – Desarrollo de un alimentador artificial.....</b>	<b>71</b>
<b>ANEXO 3 – Producciones científicas .....</b>	<b>78</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>79</b>

## RESUMEN

Las enfermedades causadas por flavivirus son un tema de gran preocupación para la salud pública en todo el mundo. En las últimas décadas, América del Sur ha sufrido epidemias de dengue, el resurgimiento de los virus de la fiebre amarilla (YFV) y la encefalitis de Saint Louis (SLEV), y la introducción de los virus del Nilo Occidental (WNV) y Zika (ZIKV). La vía principal de transmisión de estas flavivirosis es a través de la picadura de un mosquito vector. Asimismo, en los últimos años se han descrito numerosos flavivirus específicos de insectos (ISF), es decir, virus que no pueden replicarse en células de vertebrados. Se ha visto como la coinfección de flavivirus patógenos y flavivirus específicos de insecto puede alterar la capacidad vectorial de los mosquitos, y en consecuencia la transmisión de las enfermedades. Por este motivo resulta importante conocer la presencia y distribución de los flavivirus que infectan los mosquitos presentes en nuestro país.

La interacción que existe entre el virus y el mosquito es esencial para una transmisión efectiva y depende de factores tanto del virus como del artrópodo. Uno de los factores más importantes relacionados con el vector es la competencia vectorial, pues se refiere a la capacidad intrínseca del vector para ser infectado por el virus, permitir su replicación y posteriormente transmitirlo a un huésped susceptible. Además, la habilidad para ser un vector competente depende de barreras naturales a la infección, barreras inmunológicas y la presencia de receptores específicos para el virus. Todas estas características, sumadas a las características propias del virus, favorecerán o no su transmisión.

Por otro lado, la importancia de ZIKV ha aumentado notablemente desde el brote ocurrido en las Américas en 2015, cuando la enfermedad se asoció con trastornos congénitos. La enfermedad suele ser asintomática, pero a veces puede causar una enfermedad leve que se acompaña de fiebre, sarpullido, dolor en las articulaciones y conjuntivitis. La Organización Mundial de la Salud centró la atención en ZIKV cuando el virus se relacionó con microcefalia y enfermedades neurológicas graves, incluido el síndrome de Guillain-Barré. Aunque existe evidencia de transmisión sexual del virus, se cree que la transmisión a los seres humanos tiene un origen principalmente vectorial, asociada con *Aedes aegypti*. Esta especie de mosquito no solo se ha encontrado naturalmente infectada con ZIKV, sino que también ha sido objeto de estudio en muchos ensayos de competencia vectorial que emplean diferentes cepas de ZIKV en todo el mundo. En Argentina, el primer caso se notificó en febrero de 2016

y desde entonces se han confirmado un total de 278 casos autóctonos, sin embargo, el virus ZIKV no se ha aislado aún en ninguna especie de mosquito en el país.

El objetivo general de esta propuesta es contribuir al conocimiento de la ecoepidemiología de virus transmitidos por mosquitos de importancia sanitaria y determinar si las poblaciones argentinas de *Ae. aegypti* podrían ser un vector de ZIKV.

La primera parte de la tesis se focaliza en la detección de flavivirus, tanto de interés sanitario como específicos de insecto, en mosquitos de distintas ecorregiones argentinas. Para ello se muestrearon 20 localidades donde se recolectaron 13 especies distintas de mosquitos. Los ejemplares recolectados se dividieron en pooles y a través de técnicas moleculares se extrajo y analizó el genoma total (ARN y ADN). Las muestras positivas fueron secuenciadas y sucesivamente analizadas con técnicas bioinformáticas para su identificación. Sorpresivamente, en este estudio no se detectó ningún ARN perteneciente a flavivirus patógenos o ISF en adultos o en estadios inmaduros. Sin embargo, se detectó ADN de tipo flaviviral en varios de los pooles de *Ae. aegypti* analizados. A pesar de haber sido descrito previamente como un elemento ancestral en *Ae. aegypti*, no se detectó en todas las muestras y las secuencias analizadas no formaron un grupo monofilético, lo que posiblemente refleje la diversidad genética de las poblaciones de mosquitos en Argentina.

La segunda parte de la tesis busca dilucidar si las poblaciones argentinas de *Ae. aegypti*, que consisten en una combinación peculiar de dos ecoformas *Ae. aegypti formosus* y *Ae. aegypti aegypti*, podrían ser un posible vector de ZIKV. Para ello realizamos estudios de competencia vectorial sobre adultos de *Ae. aegypti* de la zona templada de Argentina (provincia de Buenos Aires) que involucraron una cepa local de ZIKV de la provincia de Chaco y una cepa venezolana obtenida de un caso importado. Se analizaron el cuerpo, las patas y la saliva, para calcular las tasas de infección, transmisión y diseminación a distintos días post infección (DPI). Los resultados mostraron que ambas cepas pudieron infectar a los mosquitos en todos los DPI, mientras que se observó diseminación y transmisión en todos los DPI para la cepa argentina, pero solo a los 14 DPI para la cepa venezolana. Este estudio demuestra la capacidad de los mosquitos *Ae. aegypti* de Argentina para ser infectados por dos cepas de ZIKV, ambas pertenecientes al linaje asiático, y que el virus puede diseminarse a las patas y las glándulas salivales del mosquito.

## SUMMARY

Diseases caused by flaviviruses are a major public health burden across the world. In the past decades, South America has suffered dengue epidemics, the re-emergence of yellow fever (YFV) and St. Louis encephalitis (SLEV) viruses, and the introduction of West Nile (WNV) and Zika (ZIKV) viruses. The main route of transmission of these flaviviruses is through the bite of a mosquito-vector. In addition, many insect-specific flaviviruses (ISFs) that cannot replicate in vertebrate cells have been recently described. It has been noticed how the coinfection of mosquito-borne flaviviruses and insect-specific flaviviruses can alter the vector competence of mosquitoes, and consequently the transmission of diseases. For this reason, it is important to know the presence and distribution of flaviviruses that infect mosquitoes present in our country.

The interaction between virus and mosquito is essential for effective transmission and depends on specific factors of both the virus and the arthropod. One of the most important factors related to the vector is vector competence, as it refers to the intrinsic capacity of the vector to become infected with the virus, allow its replication and subsequently transmit the virus to a susceptible host. Furthermore, the ability to be a good vector depends on natural barriers to infection, immunological barriers, and the presence of specific receptors for the virus. All these characteristics, added to the characteristics of the virus, will or will not favor the transmission of the disease.

On the other hand, the importance of ZIKV has increased noticeably since the outbreak in the Americas in 2015, when the illness was associated with congenital disorders. The disease is usually asymptomatic, but sometimes it causes a mild illness that comes with fever, rash, joint pain, and conjunctivitis. The World Health Organization focused the attention on this virus when the virus was linked to microcephaly and serious neurological diseases, including Guillain-Barre´ syndrome. Although there is evidence of sexual transmission of the virus, the mosquito *Aedes aegypti* is believed to be the main vector for transmission to humans. This species of mosquito has not only been found naturally infected with ZIKV, but also has been the subject of study in many vector competence assays that employ different strains of ZIKV around the world. In Argentina, the first case was reported in February 2016 and 278 autochthonous cases have since been confirmed, however, ZIKV virus has not been isolated from any mosquito species yet in Argentina.

The general objective of this work is to contribute to the knowledge of the ecoepidemiology of viruses transmitted by mosquitoes of medical importance and to determine if the Argentine populations of *Ae. aegypti* could be a vector of ZIKV.

The first part of the thesis focuses on the detection of both mosquito-borne flaviviruses and insect-specific flavivirus in mosquitoes from different ecoregions of Argentina. For this purpose, 20 localities were sampled and 13 different mosquitoes' species were collected. The collected specimens were divided into pools and the total genome (RNA and DNA) was extracted and analyzed by using molecular techniques. The positive samples were sequenced and subsequently analyzed with bioinformatics techniques for their identification. We did not find any RNA belonging to pathogenic flaviviruses or ISFs in adults or immature stages. However, flaviviral-like DNA similar was detected in several pools of *Ae. aegypti*. Despite being previously described as an ancient element in the *Ae. aegypti* genome, it was not detected in all samples and sequences obtained did not form a monophyletic group, possibly reflecting the genetic diversity of mosquito populations in Argentina.

The second part of this thesis tries to elucidate if *Ae. aegypti* from Argentina, which are a combination of two subspecies *Ae. aegypti formosus* and *Ae. aegypti aegypti*, are able to transmit ZIKV. Therefore, we conducted vector competence studies with *Ae. aegypti* from the temperate region of Argentina (Buenos Aires province) that involved a local strain of ZIKV from Chaco province, and a Venezuelan strain obtained from an imported case. Body, legs and saliva were tested in order to calculate infection, dissemination, and transmission rates at 7, 11 and 14 days post infection (DPI), respectively. Both strains were able to infect mosquitoes at all DPIs, whereas dissemination and transmission were observed at all DPIs for the Argentinian strain but only at 14 DPI for the Venezuelan strain. This study proves the ability of *Ae. aegypti* mosquitoes from Argentina to become infected with two different strains of ZIKV, both belonging to the Asian lineage, and that the virus can disseminate to the legs and salivary glands.

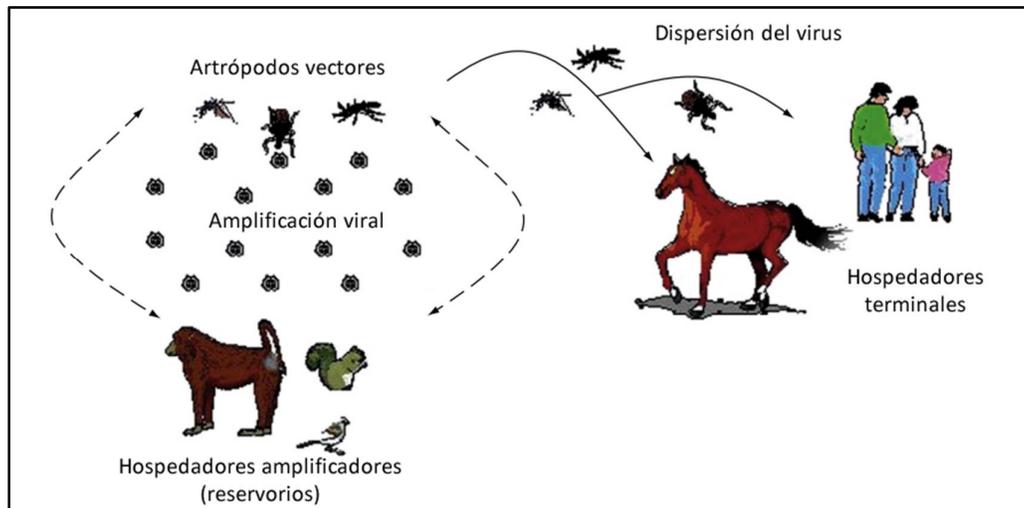
## INTRODUCCIÓN GENERAL

### ARBOVIRUS

La palabra arbovirus deriva del inglés "*arthropod-borne virus*" y se utiliza para describir un grupo de virus mantenidos en la naturaleza principalmente a través de la transmisión biológica entre huéspedes vertebrados susceptibles y artrópodos hematófagos [1]. Los arbovirus son un grupo heterogéneo de más de 500 virus, transmitidos por una gran variedad de vectores como mosquitos, flebótomos y garrapatas entre otros, con un gran impacto en la salud pública a nivel mundial [2]. Los vertebrados en los que se han detectado arbovirus incluyen aves y mamíferos [1]. De todos los arbovirus que causan enfermedades en el hombre, más del 90 % son transmitidos por mosquitos [3], y alrededor de 100 causan enfermedad en humanos y 40, en animales domésticos [1]. La transmisión puede ser vertical, desde una hembra a la progenie, aunque la ruta de transmisión más frecuente entre los arbovirus es la horizontal, a través de la picadura de un vector hacia un hospedador [4]. En este último caso, la transmisión tiene lugar entre un vertebrado infectado que desarrolla viremia y un artrópodo hematófago (vector) que al picar al vertebrado virémico, ingiere sangre (Figura 1). En el artrópodo, el virus también replica y se acumula en las glándulas salivales. De esta manera cuando el vector pica a otro vertebrado susceptible le inyecta saliva junto con el virus [4].

Las infecciones por arbovirus pueden causar un amplio espectro de manifestaciones clínicas en el hombre que van desde infecciones subclínicas asintomáticas a cuadro febriles inespecíficos y manifestaciones típicas de la enfermedad (rash cutáneo, dolor retro-orbital, mialgias, artralgias) [2]. En una menor proporción de individuos, se pueden manifestar cuadros más severos como artritis, encefalitis o fiebres hemorrágicas, mientras que los cuadros severos pueden asociarse a tasas mayores de mortalidad [5]. El diagnóstico serológico de estas infecciones no permite diferenciar el agente etiológico viral hasta el nivel de familia y género debido a reacciones antigénicas cruzadas, por lo cual en la mayoría de los casos es necesario recurrir a técnicas moleculares siempre que sea posible [6].

Como se mencionó anteriormente, los arbovirus son virus transmitidos por artrópodos hematófagos, por lo cual su clasificación se debe a un agrupamiento ecológico y no taxonómico. Si bien los mismos pueden poseer distintos tipos de genomas (ARN simple cadena de sentido positivo o negativo, ARN doble cadena, ADN doble cadena) y pertenecen



**Figura 1.** Ciclo de transmisión típico de arbovirus. Para que la transmisión tenga lugar deben cumplirse tres condiciones: (1) debe haber un hospedador vertebrado susceptible, en general un mamífero o ave; (2) durante la infección del vertebrado, debe producirse una fase virémica (es decir, un momento en el que el virus está presente en el torrente sanguíneo en un título (cantidad) y por un tiempo suficiente para poder infectar a un artrópodo durante la ingesta sanguínea); y (3) el virus debe poder replicarse en la especie de artrópodo que ingiere sangre. (Adaptada de Artsob H. y col., 2017).

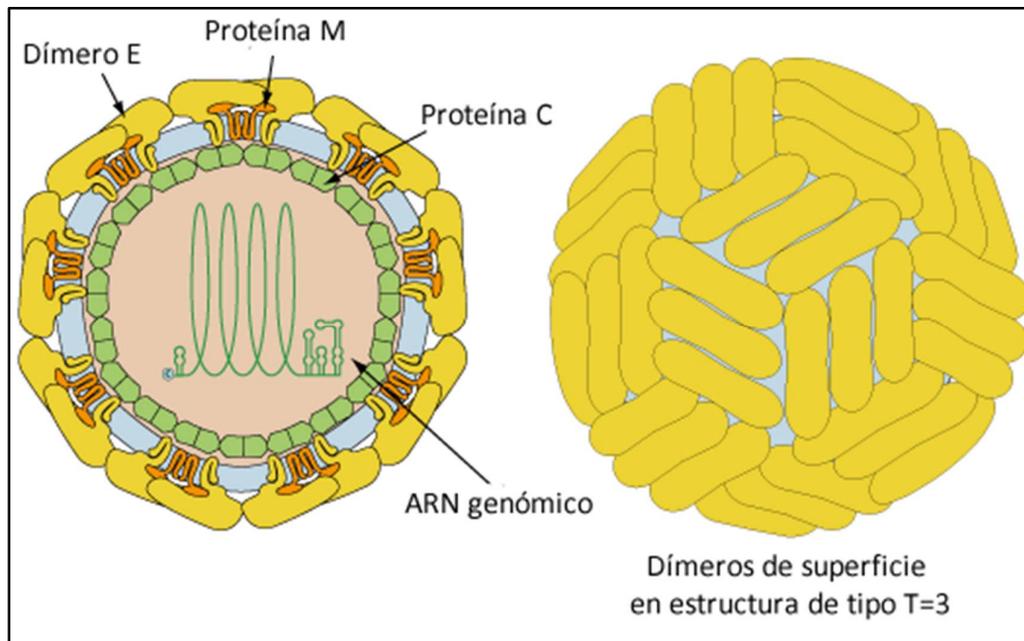
a, al menos, ocho familias de virus, la mayoría son esféricos, envueltos, con un genoma ARN de cadena simple y pertenecientes a tres familias: *Flaviviridae*, *Togaviridae* y *Peribunyaviridae* [1,7]. Dentro de la familia *Flaviviridae* se encuentran los géneros *Flavivirus* (del latín *flavus*, "amarillo"), *Pestivirus* (del latín *pestis*, "plaga") y *Hepacivirus* (del griego *hepar*, *hepatos*, "hígado") [8]. Los miembros de esta familia comparten similitudes en la morfología del virión, la organización genómica y la estrategia de replicación, pero presentan diferentes propiedades biológicas y falta de reactividad serológica cruzada [9].

## EL GÉNERO *FLAVIVIRUS*

### Características estructurales y genómicas

Los flavivirus son pequeños virus esféricos de aproximadamente 40 a 60 nm de diámetro. Su genoma está protegido por una cápside proteica (C) la cual está rodeada por una envoltura lipoproteica modificada por la inserción de dos glicoproteínas virales integradas de membrana: las proteínas E (envoltura) y M (membrana) (Figura 2) [9,10]. Debido a la presencia de envoltura lipídica son susceptibles a las lipasas y solventes lipídicos. En general,

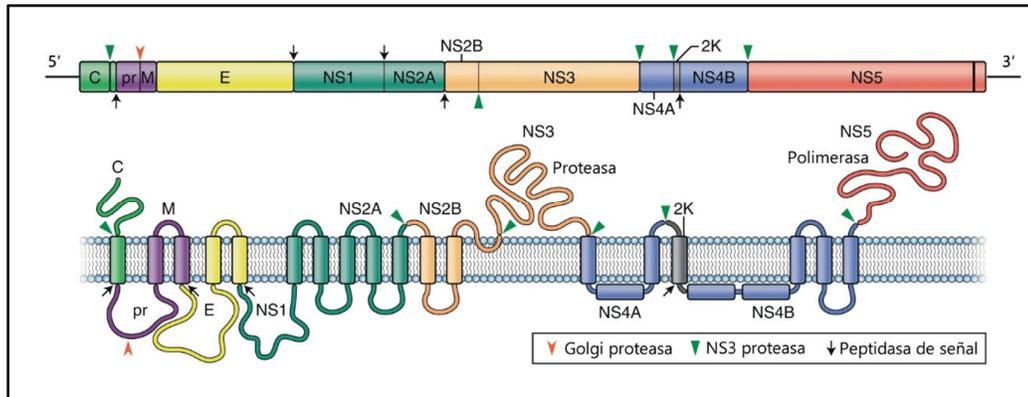
los flavivirus son sensibles a los pH ácidos y temperaturas elevadas, luz ultravioleta, radiación gamma, y diferentes desinfectantes como alcohol, fenol y cloro, entre otros [8].



**Figura 2. Estructura del virión.** Virus esférico, envuelto de aproximadamente 50 nm de diámetro. Las proteínas de la superficie están dispuestas en una simetría de tipo icosaédrica. Los viriones maduros contienen dos proteínas de membrana codificadas por virus (M y E), mientras que los viriones inmaduros contienen un precursor de proteína de membrana. (Adaptación de ViralZone 2016, Swiss Institute of Bioinformatics).

El genoma de los flavivirus consiste en una molécula de ARN de cadena simple, de polaridad positiva de aproximadamente 11 kilobases (kb) que presenta un extremo 5' no codificante (5'UTR, del inglés *Untranslated Region*) de aproximadamente 100 nucleótidos (nt), un marco de lectura abierto (ORF, del inglés *Open Reading Frame*) y el extremo 3' no codificante (3'UTR) de 400-700 nt (Figura 3) [9]. El marco de lectura abierto codifica para una poliproteína que es procesada co y post-traduccionalmente por proteasas virales y del hospedador. Esta poliproteína codifica para diez proteínas: tres proteínas estructurales: la cápside (C), la pre- membrana (prM) que se escinde para dar origen a la membrana (M), y la envoltura (E); seguidas de siete proteínas no estructurales (NS1-NS2A-NS2B-NS3- NS4A-2K- NS4B-NS5) las cuales están involucradas principalmente en la replicación viral. Además, estas proteínas intervienen en el ensamblaje del virión y la evasión de la respuesta del sistema

inmune natural del hospedador [8,9]. Las características principales de estas proteínas están listadas en la Tabla 1.



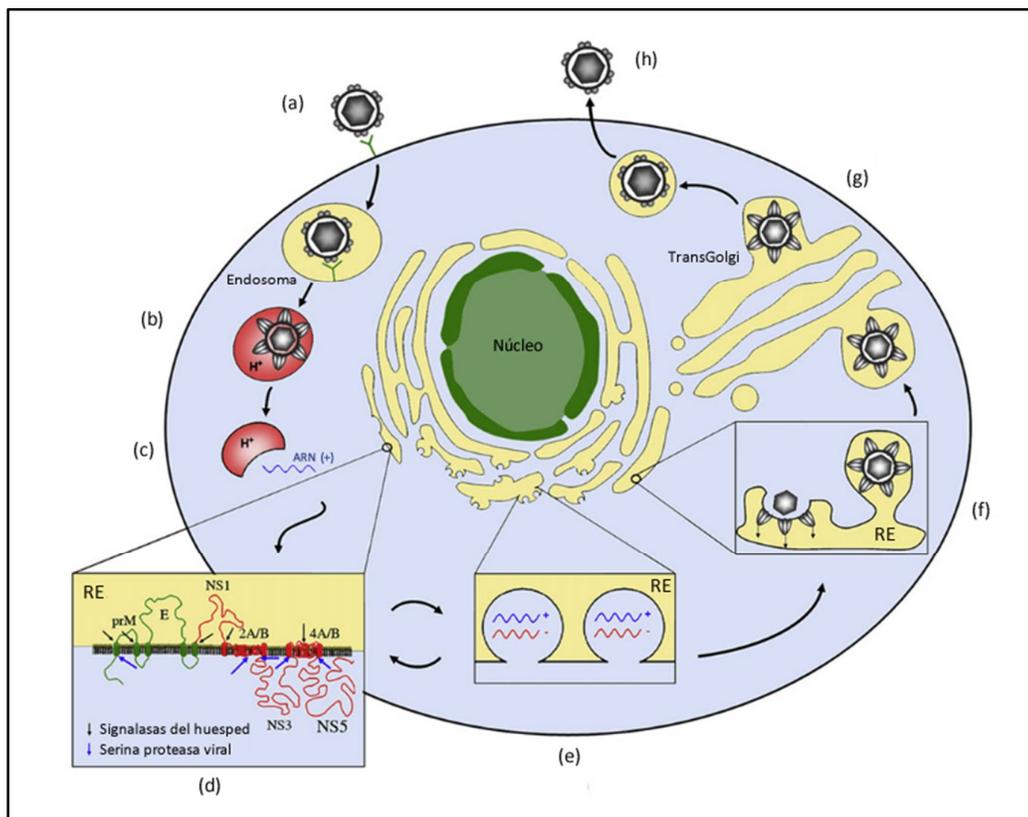
**Figura 3. Organización del genoma de los flavivirus.** Los flavivirus codifican un único marco de lectura abierto que se traduce en el retículo endoplásmico en una poliproteína, que posteriormente es escindida por proteasas tanto virales como de la célula huésped. Este procesamiento da como resultado diez proteínas funcionales que incluyen las tres proteínas estructurales C, prM y E, y siete proteínas no estructurales (NS). (Adaptada de Pierson T. y Diamond M. S., 2020)[11].

**Tabla 1. Características principales de las proteínas estructurales y no estructurales de los flavivirus.**

Nombre	KDa	Características	Función
<b>C</b>	9-12	Alta proporción de aminoácidos básicos	Nucleocápside
<b>prM</b>	18-12	Glicosilada	Plegamiento, asociación a la membrana, ensamblaje de la proteína E
<b>M</b>	8	No glicosilada	
<b>E</b>	53-54	Altamente conservada	Unión a los receptores, fusión con las membranas celulares
<b>NS1</b>	42-50	Dos o tres sitios de N-glicosilación	Replicación, patogénesis, inmunoevasión
<b>NS2A</b>	18-22	Bajo nivel de conservación. Hidrofóbica	Coordinación del ensamblaje, replicación del genoma
<b>NS2B</b>	13-15	Bajo nivel de conservación	Co-factor de NS3 serin-proteasa
<b>NS3</b>	67-70	Asociada a la membrana; altamente conservada	Serin-proteasa, helicasa, replicación ARN-trifosfatasa
<b>NS4A</b>	16	Bajo nivel de conservación	Replicación, ensamblaje, inducción de reordenamiento de membrana
<b>NS4B</b>	27-28	Bajo nivel de conservación	Ensamblaje
<b>NS5</b>	104-106	Altamente conservada	Metiltransferasa, ARN-polimerasa dependiente de ARN

## Replicación

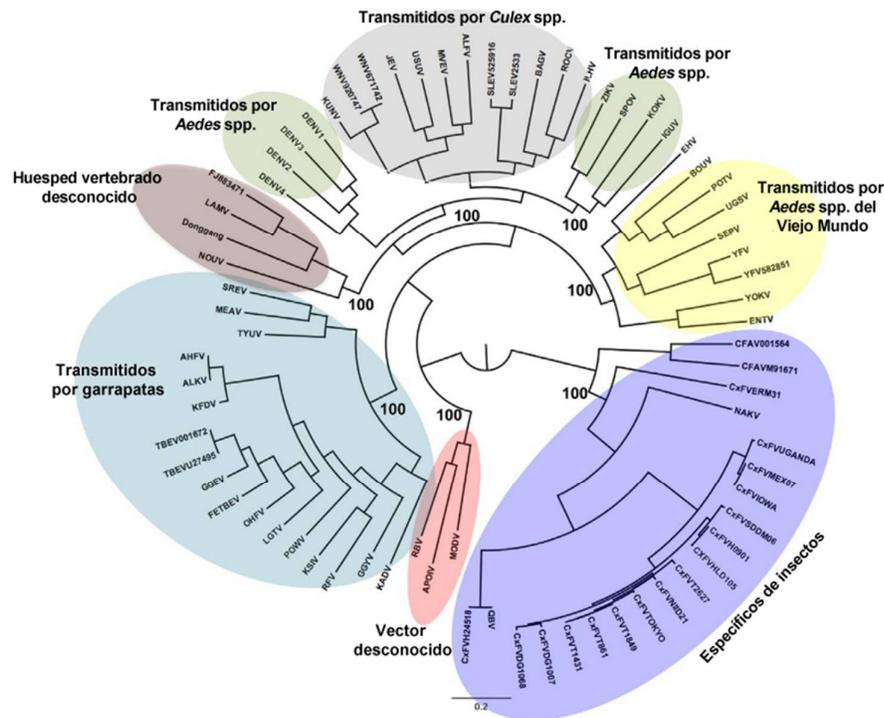
Los flavivirus ingresan a la célula huésped por endocitosis mediada por receptores (a) formando endosomas tempranos que van disminuyendo su pH (Figura 4) [9]. El ambiente ácido induce la fusión (b) entre el virus y la membrana del huésped, lo que resulta en la liberación del genoma desnudo al citoplasma (c). A la traducción del ARN viral sigue el procesamiento de la poliproteína resultante por parte del hospedador y de las proteínas codificadas por el virus (d). Luego de la traducción, se ensambla un complejo de replicación asociado a membranas inducidas por el virus donde tiene lugar la replicación viral (e). El complejo de replicación comienza a transcribir el molde de ARN de polaridad positiva (ARN +) en ARN de polaridad negativa (ARN -), que servirá luego como molde para la síntesis de nuevos ARN +. Las nuevas cadenas de ARN + pueden iniciar un nuevo ciclo de traducción o ensamblarse en viriones (f). El empaquetamiento se produce en la superficie del retículo endoplasmático (RE), seguido de la gemación de las proteínas estructurales y del ARN recién sintetizado en el lumen del RE. Los viriones inmaduros resultantes se transportan al trans-Golgi donde la escisión de prM a M mediada por furina genera partículas infecciosas maduras (g) que se liberan por exocitosis (h) [9,12,13].



**Figura 4. Ciclo de replicación de los flavivirus.** (Adaptada de Fernandez-Garcia M. y col., 2009)[12].

## Filogenia

El análisis filogenético de los flavivirus demostró un agrupamiento de los mismos en función del vector que lo transmite, resultando una distinción en cuatro grupos principales: un grupo donde no hay vector conocido (NKV, del inglés *No Known Vector*); un grupo de flavivirus transmitidos por garrapatas (TBV, del inglés *Tick Borne Virus*); otro grupo de virus patógenos transmitidos por mosquitos (MBV, del inglés *Mosquito Borne Virus*); y finalmente un grupo conformado por flavivirus específicos de insectos (ISF, del inglés *Insect Specific Flavivirus*) (Figura 5) [14,15]. Mientras que los TBV y MBV se transmiten entre artrópodos hematófagos y hospedadores vertebrados, y están asociados a enfermedades humanas/animales graves, los ISF no pueden replicar en células de vertebrados por lo cual su rango de hospedador se limita a insectos, en su mayoría mosquitos [16].



**Figura 5. Filogenia de los flavivirus:** análisis de máxima verosimilitud de miembros seleccionados del género Flavivirus. La escala indica las sustituciones aminoacídicas por sitio. Las etiquetas de las ramas terminales indican la abreviación del virus por sus siglas en inglés. (Adaptada de Roundy C. y col., 2017)[15].

De todos los arbovirus que causan enfermedades en humanos, más del 90 % son transmitidos por mosquitos, y con el incremento de las temperaturas, la urbanización y el comercio global, el rango geográfico de los mosquitos así como el de las arbovirosis se ha ido expandiendo

[17–21]. Los flavivirus de importancia médica representan un problema mundial con, por ejemplo, epidemias anuales del virus dengue (DENV) en las Américas [22], epidemias del virus de la fiebre amarilla (YFV) en América del Sur [23], el virus del Nilo Occidental (WNV) volviéndose endémico en Europa [24] y el virus emergente Zika (ZIKV) [25]. Este avance de la morbilidad por flavivirus junto con la falta de medicamentos y vacunas autorizados, conllevan la necesidad urgente de nuevas herramientas para el control de enfermedades. En los últimos años, algunos grupos de investigación han comenzado a estudiar la competencia vectorial (o sea la proporción de vectores que habiéndose infectado con un virus pueden transmitirlo a un vertebrado), ya que diversos estudios han sugerido que el microbioma del mosquito puede alterar la susceptibilidad a ciertos flavivirus [26]. Dentro de este microbioma se encuentran los ISF, quienes podrían tener un rol modulador en la competencia vectorial durante la coinfección con otros flavivirus [27–29]. Además, se ha observado una estrecha relación filogenética entre un subgrupo de los ISF y los flavivirus de importancia sanitaria [30].

#### MOSQUITOS DE IMPORTANCIA SANITARIA

Los mosquitos pertenecen a la familia Culicidae dentro del Orden Diptera [31]. Son insectos holometábolos, lo que significa que pasan por cuatro estados durante su ciclo biológico: huevo, larva con cuatro estadios larvales (L1, L2, L3 y L4), pupa (estados inmaduros) y adulto. Los estados inmaduros necesitan agua para subsistir, mientras que la fase adulta representa la etapa aérea, principalmente destinada a la reproducción [31]. Existen algunas diferencias morfológicas entre machos y hembras. Los adultos machos son más pequeños, presentan antenas plumosas, y un aparato bucal de tipo sifonador-suctor con el cual se alimentan de sustancias azucaradas como el néctar. Por otro lado, las hembras poseen antenas filiformes, y un aparato bucal de tipo picador-suctor que les permite no solo alimentarse de sustancias azucaradas sino también de sangre, necesaria para el desarrollo de los huevos [32,33]. Esta característica las convierte en insectos vectores hematófagos [34].

Los mosquitos son los vectores mejor conocidos de agentes patógenos causantes enfermedades infecciosas, y los principales transmisores pertenecen a los géneros *Aedes*, *Anopheles* y *Culex*. Los brotes relacionados con arbovirus como DENV, ZIKV, YFV (en su ciclo urbano) y Chikungunya (CHIKV, *Togaviridae*) afectan las zonas donde están presentes las especies *Ae. aegypti* o *Ae. albopictus* [35–38].

*Aedes aegypti* (Linneaus, 1762) es un mosquito de origen africano [39,40]. Se caracteriza morfológicamente por la presencia de escamas plateadas que forman un dibujo similar a una

lira (antiguo instrumento musical) en el tórax como característica más fácilmente distinguible. En África tropical, este mosquito está presente en su forma selvática, *Ae. aegypti formosus*, de color oscuro, y coloniza principalmente criaderos de origen natural (huecos de árboles, huecos de rocas). Fuera de África, las poblaciones de esta especie están presentes en su forma doméstica, *Ae. aegypti aegypti*, entre los trópicos. Allí es altamente antropofílico, y cría en sitios artificiales como macetas, llantas, alcantarillas, y otros recipientes artificiales [41]. Podría decirse que la historia de *Ae. aegypti* acompaña a la del hombre, ya que las poblaciones humanas migraban desde las zonas áridas de África almacenando agua en recipientes artificiales durante el viaje, y estos contenedores se convirtieron en sitios privilegiados para la proliferación de los mosquitos, quienes se han ido adaptando cada vez más a un entorno humano [40]. De esta manera, *Ae. aegypti* ha ido migrando desde el continente africano donde es originario. La forma ancestral está presente como *Ae. aegypti formosus* en los bosques tropicales del África subsahariana. Con el desplazamiento de las poblaciones humanas de las regiones áridas, la forma doméstica migró hacia el norte de África, iniciando la colonización de países del Mediterráneo. A partir del siglo XV, la trata de esclavos introdujo el mosquito doméstico en América y el Caribe. Sucesivamente, con la apertura del Canal de Suez, *Ae. aegypti aegypti* fue introducido en Asia. Finalmente, el mosquito terminó colonizando las islas del Pacífico, una invasión que se completó después de la Segunda Guerra Mundial [40].

Las hembras de *Ae. aegypti* se consideran las más eficientes de los mosquitos vectores por sus marcados hábitos domésticos, que satisfacen todas sus necesidades vitales en la vivienda humana. Ponen sus huevos en lugares artificiales con agua limpia o semi-limpia, como tanques de agua, macetas y llantas usadas, lo cual representa un dato importante para su control [42]. Además, se ha demostrado que los huevos pueden resistir la desecación durante al menos un año [43], y que los estados inmaduros de *Ae. aegypti* también se adaptan a condiciones climáticas extremas: las larvas pueden permanecer viables a temperaturas muy bajas (en un rango entre 12 y 16 °C) y algunas poblaciones persisten a temperaturas superiores a 40 °C [44].

*Aedes albopictus* (Skuse, 1894), también conocido como "mosquito tigre", es originario del Sudeste Asiático. Este mosquito, común en Asia, se describió por primera vez en Calcuta, India. Antes de 1979, *Ae. albopictus* se extendía desde el Pacífico hasta el Océano Índico (Madagascar) [45]. También se encuentra en China, Japón y Corea. En Europa, el mosquito fue encontrado por primera vez en Albania en 1979, seguramente como resultado de la importación de neumáticos a través del comercio de China [46]. En 1990, el mosquito fue

detectado en Génova donde logró establecerse y luego convertirse en 2007 en una problemática, primero en Italia y después en Europa, por su capacidad de transmitir el CHIKV [47,48]. Actualmente, la especie está presente en 20 países europeos [49]. *Ae. albopictus* finalmente se estableció en los Estados Unidos en 1985 y luego se extendió muy rápidamente por todo el país hasta México. También invadió América del Sur y especialmente Brasil desde 1986. Además, se ha detectado en algunos países africanos como Nigeria, Camerún, Gabón, Sudáfrica y Guinea Ecuatorial [50]. La capacidad de este mosquito para colonizar y asentarse en nuevas áreas geográficas refleja su gran plasticidad ecológica. Su capacidad para establecerse en zonas templadas representa un temor por la introducción de los arbovirus que la especie puede transmitir. De hecho, en la última década se han detectado brotes autóctonos de dengue transmitido por esta especie en algunos países europeos como Croacia, Francia, España e Italia [51–54], donde la enfermedad no es endémica.

Las dos especies, *Ae. aegypti* y *Ae. albopictus*, comparten muy a menudo el mismo nicho ecológico, por ejemplo, en América del Norte, América del Sur, África Central y la región del Océano Índico. En algunos casos, *Ae. albopictus* exhibe una capacidad competitiva superior que lo favorece sobre *Ae. aegypti* [36].

En Argentina, se han identificado 244 especies de mosquitos, 35 pertenecientes a la familia *Anophelinae* y 207 a la familia *Culicinae* [55]. Dentro de la tribu *Aedini* destacan por su importancia sanitaria *Ae. aegypti* que se extiende desde el norte del país hasta las provincias de Neuquén y Río Negro [56,57], y es el principal vector de dengue en el país [58], y *Ae. albopictus* que se encuentra actualmente confinado a las provincias de Misiones y Corrientes [59,60]. Las especies del género *Culex* subgénero *Culex* presentan un amplio rango de distribución desde el norte hasta el sur del país. En particular las del complejo *pipiens*, *Culex pipiens pipiens* ocupa las zonas más frías mientras que la subespecie *Cx. pipiens quinquefasciatus* las zonas subtropicales, existiendo en la región Centro formas híbridas [61]. Los mosquitos del género *Culex* son responsables de la transmisión de WNV y SLEV en el país [62,63].

La distribución de las especies de mosquitos, y como consecuencia, la de los patógenos transmisores de enfermedades a ellos asociados, se ve afectada por algunos factores como el cambio climático, las modificaciones ambientales antrópicas, el transporte, las actividades comerciales y las conductas humanas, entre otros [22,64,65]. La temperatura es uno de los factores ambientales potencialmente afectado por el cambio climático que puede alterar la dinámica de transmisión de estas enfermedades, pudiendo afectar los ciclos de los patógenos tanto en el mosquito [66], como en los seres humanos y en otros huéspedes o reservorios

[65–68]. También puede modificar el comportamiento de los vectores (tasas de alimentación y capacidad vectorial), y condicionar la supervivencia y distribución de los mosquitos (incluida la diapausa estacional de especies invasoras en regiones templadas, necesaria para su establecimiento en tales climas), la abundancia (tasas de eclosión y mortalidad de adultos) y el rango estacional. Por otro lado, la distribución de los mosquitos y su abundancia también suelen estar asociadas a las precipitaciones [68–70], y aún no resulta claro si otros factores climáticos (como el viento y la humedad) podrían tener un rol similar, aunque menos importante. Por otra parte, algunos factores antropogénicos como la densidad de población, el uso de la tierra, los viajes, las migraciones y el comercio internacional pueden crear nuevos hábitats adecuados para el establecimiento de algunas especies de mosquitos [71–73]. Además, otros factores como la presencia de hospedadores o reservorios, rutas de aves migratorias o hábitats particulares como los humedales contribuyen a la dinámica de los mosquitos [74].

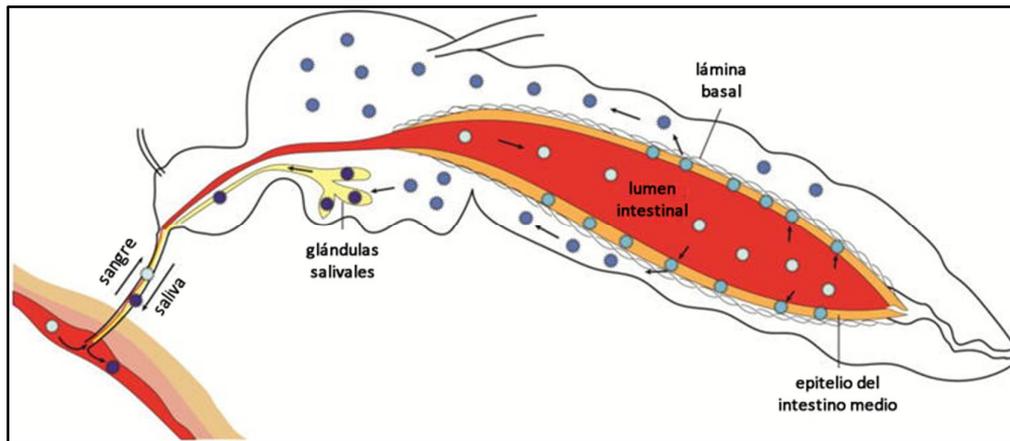
#### INTERACCIÓN VIRUS-MOSQUITO

En el mundo existen 3698 especies de mosquitos, sin embargo, no todas ellas son vectores comprobados de patógenos que causan enfermedades [31]. Para que un mosquito pueda transmitir un virus, es necesario que sea genéticamente competente.

La competencia vectorial define la capacidad de un artrópodo para transmitir un virus o un patógeno determinado, y está sujeta a factores tanto genéticos como no genéticos (por ejemplo ambientales). Puede variar según la especie de mosquito, las poblaciones locales e incluso entre individuos de una misma población. Es una medida cuantitativa más que cualitativa por lo que rara vez todos los mosquitos de una determinada especie o población transmiten un virus determinado. Por lo tanto, la competencia del vector generalmente se expresa como una proporción (%) [75]. La competencia vectorial de una determinada población de mosquitos también depende del virus, e incluso diferentes cepas de la misma especie de virus pueden producir cambios en la competencia de una población de mosquitos [76,77].

Para que el virus pueda transmitirse debe atravesar cuatro barreras tisulares dentro del mosquito (Figura 6) [75]. Cuando un mosquito ingiere sangre infectada, el virus debe infectar y replicarse con éxito en las células epiteliales del intestino medio. Por lo tanto, el intestino medio es el primer tejido en el que se producen interacciones entre virus y células del mosquito que pueden influir en el resultado de la infección. Los mosquitos en los que el virus

no puede unirse, entrar y/o replicarse dentro del intestino tienen una barrera de infección en el intestino medio. Esta barrera está típicamente asociada con la presencia de receptores en la superficie de las células epiteliales del intestino, o por determinantes no genéticos como la densidad y composición del microbioma [26]. Sin embargo, una vez que un virus ha establecido la infección del intestino medio, debe atravesar la lámina basal que rodea el epitelio del intestino medio para diseminarse por el resto del mosquito. Cuando la replicación del virus se limita al intestino medio y no se produce la diseminación, se dice que los mosquitos tienen una fuerte barrera de escape del intestino medio. La lámina basal del intestino medio presenta una barrera física para el virus, y el grosor de la misma se ha relacionado previamente con una menor diseminación de virus, como en el caso de DENV-1 en diferentes poblaciones de *Ae. albopictus* [78]. Otra barrera anatómica crucial para la infección es la barrera de infección de las glándulas salivales. Tras la infección de las glándulas salivales, el virus se replica y se deposita en las cavidades apicales de las células acinares para ser expectorado con la saliva. Sin embargo, no todos los mosquitos pueden expectorar el virus, y por lo tanto tendrán una barrera de escape de las glándulas salivales, resultando mosquitos no competentes.

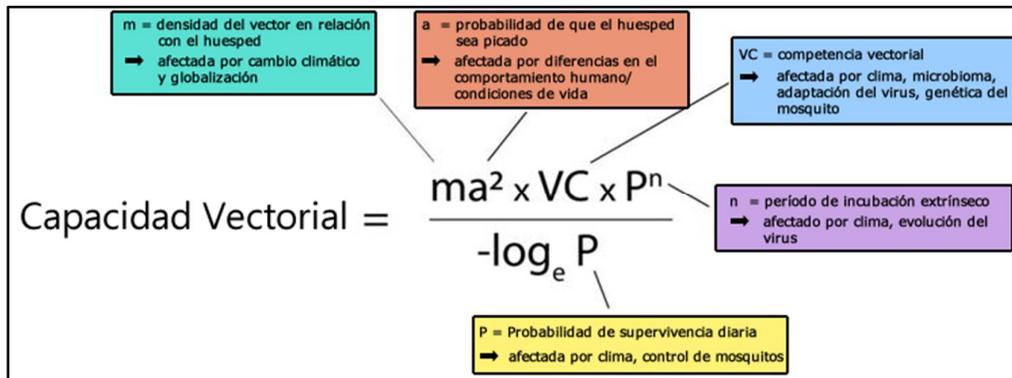


**Figura 6. Diferentes barreras tisulares determinan la competencia vectorial en los mosquitos.** El mosquito absorbe un arbovirus durante una ingesta de sangre infectada. El virus infecta el epitelio del intestino medio y se replica antes de pasar a través de la lámina basal a la hemolinfa y diseminarse por todo el cuerpo del mosquito. Para ser transmitido al siguiente huésped, el virus tiene que infectar y replicarse en las glándulas salivales desde donde puede ser liberado a la saliva y transmitido al próximo huésped. (Adaptada de Rückert C. y Ebel G., 2018)[75].

La transmisión y dispersión de los arbovirus están influenciados por factores intrínsecos (como la cepa viral, la competencia vectorial, y la susceptibilidad del huésped) y extrínsecos

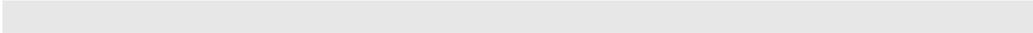
(como la temperatura, las precipitaciones, y la actividad antrópica). Estos factores están organizados e integrados en el concepto de capacidad vectorial, permitiendo esclarecer cómo afectan la transmisión de los agentes patogénicos causantes de las enfermedades vectoriales, y cómo impactan en la salud humana [79].

Un modelo matemático permite definir la capacidad vectorial (Figura 7) [75]. Los factores que influyen en la capacidad vectorial son la densidad del vector con respecto al huésped (m), la probabilidad diaria de que el vector se alimente sobre el huésped (a), la competencia vectorial (VC), la probabilidad de supervivencia diaria (P) y el período de incubación extrínseco (n) [75]. Las variables más influyentes en la fórmula son la probabilidad de supervivencia diaria del mosquito y el período de incubación extrínseco (PIE). El PIE se refiere a la cantidad de tiempo que tarda un virus en infectar el intestino medio y diseminarse a la saliva (es decir, el tiempo entre la absorción del virus y la capacidad de transmisión). Sin embargo, el PIE se ve afectado por las condiciones ambientales, como la temperatura [80], así como por factores genéticos [81] que influyen en la competencia vectorial de la población de mosquitos. Los virus pueden adaptarse a una diseminación más rápida en especies de mosquitos susceptibles y así acortar el PIE.



**Figura 7. Fórmula de la capacidad vectorial.** La fórmula de la capacidad vectorial describe la tasa de reproducción básica de un patógeno transmitido por un vector por parte de una especie o población de un vector en particular. (Adaptada de Rückert C. y Ebel G., 2018)[75].

Otro mecanismo importante para limitar la replicación del virus en todo el cuerpo del mosquito es la respuesta inmunitaria antiviral del mosquito. La defensa antiviral más específica y potente es la del ARN de interferencia (RNAi, del inglés **RNA interference**). Esta vía actúa como respuesta inmune primaria de los mosquitos contra los arbovirus a través de



la activación de patrones moleculares asociados a patógenos. Estos pequeños ARN pueden apuntar al ARN viral para su degradación. Esta respuesta secuencia-específica puede ser muy eficaz para controlar la replicación viral, y muchos virus han desarrollado mecanismos para antagonizar o evadir la respuesta del RNAi [82]. Todas las respuestas antivirales de los mosquitos pueden ejercer presiones selectivas sobre el virus, pero el RNAi es único en su especificidad de secuencia, lo que representa una presión evolutiva directa sobre el genoma viral [75].

Las barreras tisulares presentes en los mosquitos junto con las respuestas antivirales contribuyen al fenotipo general de la competencia del vector.

## OBJETIVOS E HIPÓTESIS

### OBJETIVOS GENERALES

El objetivo general de esta propuesta es contribuir al conocimiento de la ecoepidemiología de virus transmitidos por mosquitos de importancia sanitaria y determinar si las poblaciones argentinas de *Ae. aegypti* podrían ser un vector de ZIKV. La primera parte se abordó desde el estudio de mosquitos capturados a campo en distintas regiones biogeográficas de Argentina, principalmente del género *Aedes*, y en particular *Ae. aegypti*, dada su importancia en la transmisión de flavivirus. La segunda parte se abordó desde estudios de competencia vectorial a partir de colonias de mosquitos ya establecidas en laboratorio.

### OBJETIVOS ESPECÍFICOS

I. Estudiar la presencia de flavivirus y de secuencias de virus de ARN no retrovirales integradas (NIRVS) en mosquitos adultos y en estados inmaduros de especies de Argentina recolectadas a campo en seis ecorregiones diferentes entre los años 2017 y 2019.

II. Estudiar la competencia vectorial de una población de *Ae. aegypti* de provincia de Buenos Aires frente a dos cepas de ZIKV (provenientes de un caso autóctono y uno importado), con el fin de determinar no sólo si la población de mosquitos de esta región sería capaz de transmitir el virus, sino también los diferentes niveles de competencia vectorial según el origen de la cepa viral.

### HIPÓTESIS:

I. Los mosquitos de distintas regiones de Argentina presentan infecciones por flavivirus de importancia sanitaria y flavivirus específicos de insectos, lo que puede impactar en su competencia vectorial.

II. La población de *Ae. aegypti* del área templada de Argentina es competente para la transmisión de ZIKV.

## PARTE I

### BÚSQUEDA E IDENTIFICACIÓN DE FLAVIVIRUS EN MOSQUITOS DE INTERÉS

#### SANITARIO

---

##### I.1. INTRODUCCIÓN

Todos los virus dentro del género *Flavivirus* poseen una similar organización genómica, como se mencionó previamente (Introducción general – El género *Flavivirus*). A pesar de esta similitud, poseen diferencias fundamentales en su rango de hospedador y en su transmisibilidad, siendo clasificados en cuatro grupos: NKV, TBV, MBV, ISF [14–16].

##### I.1.1. Flavivirus de importancia sanitaria

Algunas de las enfermedades humanas más relevantes causadas por flavivirus transmitidos por mosquitos con capacidad de replicar en células de vertebrados (MBV) presentan un amplio espectro de síntomas que incluyen fiebre, artralgia, erupción cutánea, fiebre hemorrágica y encefalitis. Entre los flavivirus de importancia sanitaria se encuentran YFV, DENV, WNV, SLEV y ZIKV [1].

Históricamente, el flavivirus de mayor importancia ha sido YFV, el cual es endémico en las zonas tropicales de África y de América Central y del Sur [1]. Hay tres tipos de ciclos de transmisión. El primero es el de fiebre amarilla selvática, en el que participan habitualmente primates no-humanos y mosquitos de los géneros *Aedes*, *Haemagogus* y *Sabethes*; en este caso la transmisión a humanos ocurre de manera accidental a través de la picadura de mosquitos infectados. Este ciclo es el más común en América Central y del Sur [83–85]. El segundo ciclo posible es el de fiebre amarilla intermedia, el cual ocurre en ciertas regiones húmedas de África, donde algunas especies de *Aedes* pueden criar tanto en ambientes selváticos como en proximidad de ambientes domésticos. Estos vectores infectan tanto a primates no-humanos como al hombre. Es el tipo de brote más frecuente en África [83,85]. Finalmente se encuentra el ciclo de fiebre amarilla urbana, asociado con las grandes epidemias que se producen cuando las personas infectadas introducen el virus en zonas muy pobladas, con gran densidad de mosquitos (principalmente *Ae. aegypti*). En estas condiciones los mosquitos infectados transmiten el virus de una persona a otra [83,85]. La mayoría de los individuos infectados no presentan síntomas o son leves, y cuando éstos se presentan, se observa fiebre, cefaleas, ictericia, dolores musculares, náusea, vómitos y

cansancio [83]. Una pequeña proporción de pacientes infectados presentan síntomas graves, y aproximadamente la mitad de estos casos fallecen en un plazo de 7 a 10 días [85,86]. Existen características ecológicas que ponen a nuestro país en riesgo de transmisión de YFV. Desde el 2001 hasta la fecha, el virus reemergió en el límite entre Brasil y Argentina (principalmente en la provincia de Misiones). El brote ocurrido entre 2007 y 2009 registró una alta mortalidad en primates no humanos, mientras que el virus fue aislado a partir de cadáveres de monos, pacientes humanos, y en la especie de mosquito *Sabethes albiprivus* en Argentina [87,88]. Durante el 2008-2009 se detectó en Argentina la reemergencia de la fiebre amarilla selvática con la confirmación de 9 casos humanos en la provincia de Misiones [89]. La fiebre amarilla puede prevenirse con una vacuna muy eficaz, segura y asequible. Una sola dosis es suficiente para conferir inmunidad y protección de por vida, sin necesidad de dosis de refuerzo [85,90].

Actualmente, el flavivirus que representa la mayor amenaza a nivel mundial es DENV, con sus cuatro serotipos (DENV-1, DENV-2, DENV-3 y DENV-4). La infección por un serotipo produce inmunidad permanente contra la reinfección por el mismo; sin embargo, la infección sucesiva con dos serotipos diferentes es un factor de riesgo para desarrollar las formas graves de la enfermedad [91,92]. La enfermedad habitualmente se manifiesta como un cuadro gripal o febril inespecífico, aunque en una porción de individuos puede presentarse como un cuadro más severo [2]. La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que 2500 millones de personas en más de 100 países corren el riesgo de contraer dengue [69]. Las especies de mosquitos más importantes implicadas en la transmisión del virus incluyen *Ae. aegypti*, vector principal y *Ae. albopictus*, considerado como vector secundario de DENV. En Argentina, *Ae. aegypti* se reintrodujo en 1986 [61] y hoy en día está establecido en todas las provincias del norte y centro, siendo su límite sur las provincias de Buenos Aires [93] y Neuquén [56]; además se ha detectado la presencia del mosquito en Río Negro [57]. Por otro lado, *Ae. albopictus* fue introducido en 1998 y se encuentra confinado a las provincias de Misiones y Corrientes [59,94]. La infección por DENV ha constituido la arbovirosis de mayor importancia en Argentina desde 1997. Desde entonces han ocurrido tres importantes epidemias de dengue asociadas con *Ae. aegypti* (en 2009, 2016 y 2020), cada una de las cuales registró el mayor número de casos a nivel país hasta ese momento [95]. A pesar de la existencia de varias vacunas candidatas contra el dengue, aún no se ha aprobado ninguna en Argentina.

Por otra parte, WNV tiene una distribución global, y ha sido encontrado en todos los continentes excepto la Antártica [1]. Esta virosis ha ido creciendo de interés en el nuevo

continente desde su introducción en Norte América en 1999. Desde ese momento, el virus se ha vuelto cada vez más reconocido como una causa importante de enfermedad neurológica en humanos en América del Norte [96]. El virus se mantiene en la naturaleza a través de la transmisión entre aves y mosquitos, quienes constituyen el ciclo de transmisión enzoótico [97]. WNV ha sido aislado de 12 géneros diferentes de mosquitos, aunque las especies pertenecientes al género *Culex* son los vectores más importantes involucrados en su transmisión [97,98]. La mayoría de las especies de mosquitos que transmiten el virus de manera enzoótica son ornitófilos, aunque algunas especies como *Cx. pipiens* pueden modificar su preferencia alimentaria permitiendo el cambio de hospedador del virus y aumentando las posibilidades de causar enfermedad en equinos o en humanos [99,100]. Si bien el ciclo del virus es aún desconocido en Argentina, parecería que los individuos de *Columbina picui* podrían actuar como hospedadores de mantenimiento [62]. El aislamiento en nuestro país fue reportado por primera vez en equinos en 2006 [101], y sucesivamente se registró un pequeño brote epizoótico también en equinos en la provincia de Córdoba en 2010 [62]; además, un estudio de seroprevalencia en poblaciones silvestres de aves confirmó que ya existía actividad para WNV a fines del 2004 [102].

Por otro lado, SLEV ha sido el flavivirus causante de encefalitis de mayor importancia circulante en las Américas antes de WNV. Si bien el virus circula en América Central y del Sur, las epidemias se han dado principalmente en América del Norte. El virus es transmitido por numerosas especies de mosquitos del género *Culex* y es amplificado por especies de aves passeriformes y columbiformes [103]. Las epidemias son promovidas por factores ambientales que incluyen la temperatura, las precipitaciones, el deshielo y las condiciones del agua superficial [104,105]. Las epidemias urbanas por SLEV generalmente involucran a los mosquitos *Cx. pipiens pipiens* y *Cx. pipiens quinquefasciatus*, mientras que las epidemias rurales generalmente involucran a los mosquitos *Cx. tarsalis* y *Cx. nigripalpus* [103]. Las infecciones pueden causar desde formas asintomáticas hasta síntomas que incluyen fiebre, cefalea, náuseas, y en algunos casos evolucionar en manifestaciones neurológicas graves [1,106]. En América Latina se han notificado casos esporádicos de SLEV en humanos, pero no se informaron epidemias hasta 2005, cuando se notificó un brote sin precedentes en la ciudad de Córdoba, Argentina [107]. Durante este brote, se reportaron signos y síntomas asociados con una infección neurológica, incluidos dolor de cabeza, depresión sensorial, desorientación espaciotemporal, temblores y cambios en la percepción. Se notificaron un total de 47 casos humanos probables y confirmados [107]. Las cepas de SLEV fueron aisladas de mosquitos *Cx. pipiens quinquefasciatus* [108]. Después del brote de 2005, se produjeron

brotos adicionales por SLEV en Paraná (2006), Córdoba (2010), Buenos Aires (2010) y San Juan (2011) [109–112].

Otro flavivirus re-emergente de gran importancia es ZIKV. Históricamente, se han documentado casos esporádicos de infección humana con ZIKV en África y Asia; sin embargo, durante 2007 se documentó un brote de ZIKV en Micronesia. En 2013, se observó una mayor expansión y resurgimiento del virus cuando se identificaron epidemias de ZIKV en todo el Pacífico Sur. Posteriormente, el virus ingresó en Brasil provocando un brote en 2015 que ocasionó una alerta mundial luego de su expansión por el continente Americano y por su asociación con microcefalia en recién nacidos junto con otras complicaciones neurológicas [113]. Las manifestaciones típicas y menos graves causadas por la enfermedad incluyen un cuadro febril, artralgia, mialgia, dolor de cabeza y erupción cutánea. Los principales vectores de ZIKV son las especies de mosquito *Ae. aegypti* y *Ae. albopictus* [1]. En Argentina el virus fue detectado por primera vez en 2016, y desde entonces han ocurrido pequeños brotes, hasta el momento confinados a las provincias del norte del país (La parte II de la tesis se enfoca en ZIKV).

#### I.1.2. Flavivirus específicos de insecto

Los flavivirus específicos de insecto (ISF) fueron detectados únicamente en insectos o líneas celulares de insecto, son incapaces de replicar en células de vertebrados, y no pueden transmitirse por vía horizontal [30,114]. A su vez, los ISF forman dos linajes genéticos distintos dentro del género *Flavivirus*. Por una parte, se encuentran los denominados ISF clásicos (cISF), los cuales son filogenéticamente distintos a cualquier otro flavivirus conocido, y han sido aislados en todos los continentes con excepción de la Antártida. Por otro lado, se encuentran los ISF asociados filogenéticamente a flavivirus con doble huésped (dISF, del inglés *dual-host ISF*). Se trata de virus que han sido aislados solamente en mosquitos pero muestran una estrecha relación filogenética con los MBV [30,115].

El primer cISF aislado fue el virus Cell Fusing Agent (CFAV), descubierto en un cultivo de células de *Ae. aegypti* por su capacidad de formar sincicios en 1975 [116]. Solo a partir del 2006, CFAV fue aislado en mosquitos recolectados a campo en Puerto Rico [117], Indonesia [118], México [119], Tailandia [120], y a partir de una colonia establecida en Estados Unidos [121]. Además, secuencias similares a las de CFAV fueron encontradas en Argentina, aunque se trata de secuencias demasiado cortas (87-110bp) para la identificación inequívoca del CFAV [30]. El virus Kamiti River (KRV), es otro cISF que fue descrito luego de su aislamiento en la especie de mosquito *Ae. macintoshi* en Kenia en 1999 [122,123]. Una secuencia similar

a KRV fue también detectada en Argentina, pero una vez más, debido a la limitada longitud del genoma secuenciado (solo 124 nt de la región NS5) no fue posible determinar con certeza si se trató de KRV, por lo que se necesitan más estudios para determinar si infecciones con KRV ocurren realmente en el país. El tercer miembro del grupo cISF en ser descrito fue *Culex flavivirus* (CxFV). Este virus fue aislado por primera vez en Japón e Indonesia en 2003-2004 a partir de mosquitos del género *Culex* [124], y sucesivamente en *Culex* spp. en Argentina [125], Brasil [126], China [127], Guatemala [128], México [129], Taiwán [130], Trinidad [131], Uganda [132] y Estados Unidos [131,133]. A partir de entonces, numerosos cISF han sido detectados y aislados en la naturaleza en diferentes especies de mosquitos de diferentes regiones del mundo. Entre ellos *Aedes flavivirus* (AeFV), *Aedes galloisi flavivirus* (AGFV), *Calbertado virus* (CLBOV), *Nakiwogo virus* (NAKV), *Nienokoue virus* (NIEV), *Palm Creek virus* (PCV) y *Quang Binh virus* (QBV) [30].

Por otro lado, los dISF no están tan bien caracterizados como los cISF. El primero de estos virus reportado en literatura fue el virus Nounané (NOUV) luego de su aislamiento a partir de *Uranotaenia mashonaensis* en Costa de Marfil en 2004 [134]. Desde entonces, al menos otros ocho dISF fueron descubiertos: *Barkedji virus* (BJV), *Chaoyang virus* (CHAOV), *Donggang virus* (DONV), *Ilomantsi virus* (ILOV), *Lammi virus* (LAMV), *Marisma mosquito virus* (MMV), *Nanay virus* (NANV) y *Nhumirim virus* (NHUV). En conjunto, los dISF han sido aislados o detectados en al menos 12 especies y cinco géneros de mosquitos [30]. Falta esclarecer si este conjunto de flavivirus posee realmente un rango de hospedador restringido a los mosquitos, ya que otros dípteros no suelen ser estudiados para estos virus.

Si bien los ISF han sido poco estudiados hasta el momento, tienen mucho potencial en cuanto podrían ser utilizados para comprender mejor la evolución de los virus y posiblemente ayudar a prevenir la transmisión de arbovirus. Los mosquitos pueden ser infectados simultáneamente con ISF y arbovirus de importancia sanitaria, y se ha observado que varios ISF podrían afectar la capacidad de los mosquitos de adquirir, mantener y transmitir estos virus, interfiriendo por ejemplo con la competencia vectorial. Algunos experimentos in vivo demostraron que la infección persistente de mosquitos *Cx. pipiens* con CxFV puede suprimir la replicación de WNV [27]. El PCV puede suprimir la replicación de WNV y también el virus de la Encefalitis de Murray Valley [135]. Otro ejemplo de estas interferencias es dado por NHUV, quien puede suprimir la replicación de WNV y también bloquear la transmisión en mosquitos *Culex quinquefasciatus* [28,136]. Además, otros estudios demostraron de NHUV es capaz de suprimir la replicación de ZIKV y DENV-2 pero no de CHIKV en células derivadas de *Ae. albopictus* [29]. Los mismos autores sugieren que NHUV puede interferir con la

infección de ZIKV en el intestino y en las glándulas salivales de *Ae. aegypti*. Por último, la coinfección de CFAV y el virus Phasi charoen-like (PCLV, *Phenuiviridae*) limita la replicación de arbovirus en líneas celulares de *Aedes* [137]. Asimismo, se ha observado como la infección con CFAV aumenta significativamente la replicación de DENV, y viceversa, la infección con DENV aumenta la replicación de CFAV en células de mosquito [138]. También se ha visto como la transmisión de WNV por *Cx. quinquefasciatus* se ve aumentada durante la coinfección con CxFV [139]. La interacción entre ISF y MBV no resulta siempre predecible, sino que parece variar dependiendo de las cepas virales consideradas y el mosquito transmisor.

### I.1.3. Transmisión viral

Los arbovirus pueden mantenerse en la naturaleza mediante la transmisión horizontal (TH), en la que el virus circula entre huéspedes y vectores, o mediante la transmisión vertical (TV), en la que el virus se transmite transováricamente de los mosquitos hembra infectados a su descendencia. También se han aislado o detectado un número cada vez mayor de arbovirus en el tracto urogenital y las secreciones sexuales de sus huéspedes vertebrados, lo que indica la posibilidad de transmisión sexual de estos virus. El arbovirus de transmisión sexual más ampliamente reconocido es el ZIKV, pero otros arbovirus, incluidos el virus de la fiebre hemorrágica de Crimea-Congo y el DENV, también pueden transmitirse, aunque ocasionalmente, por esta vía [140].

Todos los arbovirus patógenos para los seres humanos se mantienen principalmente en ciclos zoonóticos. Los reservorios de estos ciclos incluyen aves (ej. WNV), primates no humanos (ej. YFV) y pequeños roedores (ej. virus de la encefalitis por garrapatas). Para algunos virus, como WNV, los humanos son un huésped terminal ya que no desarrollan una viremia lo suficientemente alta como para transmitir el virus a un mosquito que se alimenta de ellos. En otros casos, como DENV, ZIKV, YFV urbana y CHIKV, los seres humanos pueden actuar como huéspedes amplificadores, permitiendo que se establezcan ciclos urbanos [141].

Además, según estudios experimentales, algunos flavivirus patógenos para el hombre, como DENV, WNV y YFV, tienen tasas de TV del 5 % o menos; mientras que en ambientes naturales, estos valores son incluso más bajos, con algunos estimados por debajo del 1 % [142]. Debido a que los ISF nunca se amplifican fuera del vector, es probable que la TV sea más eficaz y desempeñe un rol mucho más importante en el mantenimiento de estos virus. Una prueba de esta eficacia fue un estudio según el cual los valores de TV de CxFV por *Cx. pipiens* fueron del 100 % [143]. Otros estudios también encontraron evidencia de TV tanto en ensayos de

laboratorio como en mosquitos recolectados a campo [27,117,122,129,133,144]. Asimismo, se han encontrado ISF en estadios inmaduros y en machos adultos en la naturaleza. Además de la TH y TV, existen otras rutas de transmisión dentro de la población de mosquitos. La transmisión venérea, en la que un mosquito macho infectado transmite el virus a un mosquito hembra no infectado, se ha documentado tanto para virus patógenos humanos [145–147] como para ISF [27]. Otra vía de transmisión de los ISF podría ser a través de plantas infectadas. Los mosquitos adultos se alimentan del néctar de las plantas como fuente de azúcar y, durante este proceso, pueden depositar virus presentes en la saliva sobre la planta o adquirir virus a partir de una planta contaminada. Muchos virus de plantas son transmitidos por insectos vectores [148], pero ningún estudio ha encontrado aún un ISF en una planta hospedera.

#### I.1.4. Integraciones virales en el genoma de los mosquitos

Además del creciente número de ISF recientemente descritos, en los últimos años se han detectado numerosas secuencias de virus de ARN no retrovirales integradas (NIRVS, del inglés *Non-retroviral Integrated RNA Virus Sequences*) al genoma de mosquitos, principalmente de los géneros *Aedes* y *Anopheles* [149].

Dado que los virus de ARN no retrovirales no codifican la transcriptasa inversa o la integrasa, son las enzimas endógenas o los virus que coinfectan la célula quienes deben participar en la integración de dichos virus en el ADN del genoma del hospedador. Para lograr la integración de los virus de ARN no retrovirales en el genoma del mosquito deben seguirse tres pasos: primero, el ARN no retroviral debe retro-transcribirse en ADN de doble hebra derivado de virus (ADNv), luego debe importarse en el núcleo y finalmente integrarse en el genoma del hospedador [149].

Las primeras NIRVS de mosquitos se identificaron en 2004 en líneas celulares y mosquitos de distintas especies de *Aedes* [150]. La mayoría de las NIRVS descritas hasta la fecha se encontraron en genomas de *Aedes* spp. De los virus de ARN detectados en 22 genomas de mosquitos, el 81 % se identificaron como NIRVS en los genomas de *Aedes* y, entre ellos, el 63 % de las NIRVS se ubicaron en el genoma de *Ae. aegypti* y el 37 % restante se identificó en *Ae. albopictus* [149].

La mayoría de estas secuencias estaban truncadas o incorporaban varios codones de STOP, pero una de ellas, integrada en el genoma de *Ae. albopictus*, contenía un marco de lectura abierto intacto, homólogo a la región NS1-NS4A de los flavivirus específicos de insectos CFAV y KRV [150]. Este último fragmento representa alrededor de la mitad del genoma flaviviral.

Estas NIRVS comprendían dos tercios del genoma flaviviral y contenían dominios enzimáticos como la helicasa y la serina proteasa. El ARNm correspondiente se detectó en células C6/36 de *Ae. albopictus*, lo que sugiere la transcripción de la NIRVS y su posible papel funcional en la célula a nivel del ARN, ya que no se detectó la expresión de proteínas [151]. Además, esta NIRVS está presente en el 97-98 % de los mosquitos *Ae. albopictus*. Se encontró que muchas de las NIRVS detectadas eran homólogas a flavivirus específicos de insectos [16,152,153].

Un avance significativo hacia la identificación de NIRVS en mosquitos fue el uso de estrategias de secuenciación de nueva generación (NGS, del inglés **N**ext **G**eneration **S**equencing) y análisis bioinformáticos. Estas estrategias de screening *in silico* revelaron que los genomas de los mosquitos contienen NIRVS que se originan a partir de genomas de ARN de Flavivirus y Rhabdovirus [149,154–157]. Específicamente, se detectaron integraciones de secuencias de ADN de ISF en los genomas de *Ae. aegypti*, *Ae. albopictus*, *Anopheles sinensis* y *Anopheles minimus*. Estas integraciones incluyen uno o más ORF virales completos que se transcriben activamente [149,156]. A pesar del conocimiento limitado de la variabilidad de la secuencia de NIRVS en las poblaciones de vectores o de cuán generalizadas están las NIRVS en las poblaciones naturales de mosquitos, se ha observado que varias especies de mosquitos muestreadas de la misma región (es decir, el sudeste de Asia) y cuyos genomas fueron analizados para las integraciones de flavivirus, mostraron diferentes niveles de integración. Además, un análisis exhaustivo de integraciones virales de 425 especies de virus de ARN no retrovirales caracterizó secuencias con similitudes solo con *Flaviviridae* (27 %), *Rhabdoviridae* (72 %), *Peribunyaviridae* y *Reoviridae* (1 %), lo que sugiere interacciones específicas de especie entre virus de ARN y mosquitos [149].

Todas estas consideraciones indican que la coevolución entre NIRVS y mosquitos es un proceso antiguo y complejo, con posibles implicancias en la competencia vectorial. Por este motivo, son necesarios análisis más exhaustivos y comparativos de estas integraciones virales y distintas poblaciones geográficas de vectores, que resultan esenciales para esclarecer si las NIRVS son linaje-específicas, cómo se distribuyen entre las poblaciones naturales del vector, y si están activas en dichas poblaciones.

## I.2. MATERIALES Y MÉTODOS

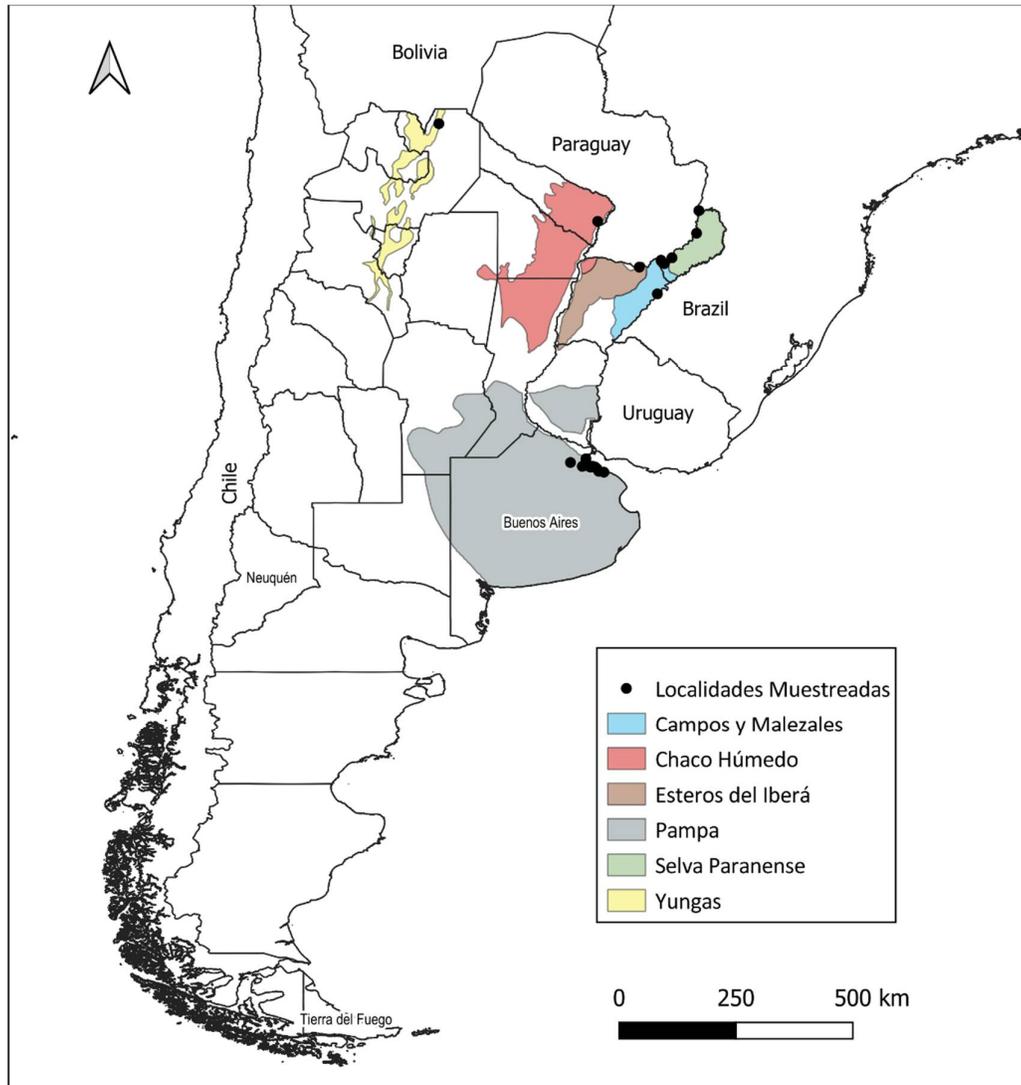
### I.2.1. Áreas de muestreo

El muestreo de mosquitos se llevó a cabo en un total de 20 localidades de diferentes ecorregiones de Argentina: Yungas, Chaco Húmedo, Selva Paranense, Campos y Malezales, Esteros del Iberá y Pampa. Estas ecorregiones se distribuyen desde el norte al centro-este de la Argentina, y sus características geomorfológicas y climáticas se extienden a sus países limítrofes (Bolivia, Paraguay, Brasil y Uruguay), representando una posible entrada de flavivirus [158] (Figura I.1).

Las Yungas se extienden desde Venezuela hasta el noroeste de Argentina, distribuyéndose aquí discontinuamente en las provincias de Salta, Jujuy, Tucumán y Catamarca. El clima es cálido y húmedo a subhúmedo, con una precipitación anual del orden de 900-1000 mm, preferentemente de verano, y se concentran a lo largo de 5 a 6 meses [158]. En esta región se muestreó la localidad de Tartagal (-22.526100, -63.799142) en la provincia de Salta, situada a 57 km de la frontera boliviana y a 103 km de la paraguaya.

La ecorregión del Chaco húmedo ocupa la mitad oriental de Formosa y Chaco, el extremo noroeste de Corrientes y norte de Santa Fe. El clima es subtropical cálido. La temperatura media anual disminuye desde los 23 °C en el límite con Paraguay, hasta los 18 °C en el centro de la provincia de Santa Fe. La concentración estacional de las lluvias (del orden de 1300 mm en el borde oriental), los desbordes de los ríos, la escasa pendiente y los suelos arcillosos dan lugar a repetidas inundaciones en vastas extensiones de la ecorregión [158]. Aquí los muestreos se realizaron en la Reserva Guaycolec (-25.982074, -58.161830), situada en la depresión oriental formoseña junto al riacho Pilagá, a unos 26 km de la ciudad capital de Formosa y unos 120 km de Asunción de Paraguay.

La Selva Paranense conforma la selva subtropical húmeda que cubre las cuencas altas de los ríos Paraná y Uruguay, en el sur de Brasil, este de Paraguay y el extremo noreste de la Argentina. En este país, ocupa casi todo el territorio de la Provincia de Misiones, donde sus límites están representados por los ríos Uruguay, Paraná e Iguazú. El clima es cálido y húmedo; las lluvias varían desde 1600 mm cerca del límite con Corrientes, hasta unos 2000 mm en el noroeste y están relativamente bien distribuidas en el año. La temperatura anual es del orden de 20 °C [158]. Las localidades muestreadas en esta región fueron Eldorado (-26.402025, -54.630785), Puerto Iguazú (-25.600918, -54.571491) y San Ignacio en la provincia de Misiones.



**Figura I.1. Sitios de recolección de las muestras.** Las localidades de muestreo de mosquitos se muestran como puntos negros. Las áreas coloreadas representan las ecorregiones.

Los Esteros del Iberá ocupan el centro norte de la provincia de Corrientes e incluyen la denominada depresión Iberana. Los diversos componentes del paisaje son reconocidos como lagunas, embalsados de vegetación flotante, esteros y bañados. Los esteros representan cauces abandonados del río Paraná, tallados y remodelados por éste en tiempos pasados [158]. Las muestras fueron recolectadas en la ciudad de Ituzaingó (-27.602147, -56.685484) en proximidad del Río Paraná en un área de monte.

La ecorregión de Campos y Malezales abarca el sector periférico de la Selva Paranaense y continúa hacia el sur de Brasil y este de Paraguay, mientras que en Argentina se extiende al suroeste de Misiones y este de Corrientes. El clima es subtropical húmedo y las lluvias

alcanzan los 1500 mm anuales, y son uniformes a lo largo del año [158]. En esta ecorregión, se realizaron muestreos en Santo Tomé (-28.550791, -56.045075) en provincia de Corrientes, y en Candelaria (-27.477546, -55.796850) y Posadas (-27.359098, -55.913876) en la provincia de Misiones.

La Pampa (o Llanura Pampeana) ocupa las provincias de Buenos Aires – excepto su extremo sur -, noreste de La Pampa y sur de Córdoba, Santa Fe y Entre Ríos. El clima es templado-húmedo a subhúmedo, con veranos cálidos. Las lluvias que se distribuyen durante el año varían desde aproximadamente 600 mm en el suroeste, hasta 1100 mm en el noreste [158]. En esta ecorregión el muestreo se concentró en la provincia de Buenos Aires donde se registró una mayor cantidad de casos de dengue en 2016 [89,159], siguiendo dos transectas imaginarias: una asociada al Río de La Plata y otra paralela más interna. La primera abarcó los municipios de Berazategui (-34.767196, -58.184963), Quilmes (-34.702868, -58.256374), Avellaneda (-34.672379, -58.342892) y Tigre (-34.405408, -58.570858) y la segunda los municipios de La Plata (-34.949289, -57.955885), Arturo Seguí (-34.887012, -58.123747), La Matanza (-34.652371, -58.548994), Lomas de Zamora (-34.706579, -58.424024), Morón (-34.642203, -58.620405), Merlo (-34.704137, -58.713958) y Luján (-34.563240, -59.128714).

#### I.2.2. Recolección e identificación de mosquitos

Se tomaron muestras de diferentes especies de mosquitos para la detección de flavivirus. La metodología dependió tanto de los comportamientos y hábitat de las diferentes especies como de la logística requerida para cada muestreo (tiempo, distancia, complejidad de acceso al sitio, etc.). Las muestras fueron obtenidas en el período comprendido entre los años 2017 y 2019 en los meses de mayor abundancia de mosquitos (de diciembre a mayo), y cada localidad se muestreó una sola vez tanto para estadios inmaduros como para adultos. Los huevos se recolectaron para las especies de *Ae. aegypti* y *Ae. albopictus*, para ello se emplearon ovitrampas utilizando como substrato de oviposición papel corrugado cubriendo todo el borde superior del recipiente por encima del nivel del agua con el fin de aumentar la superficie de colecta (Figura I.2). Además, se muestrearon larvas y pupas de las diferentes especies tanto de entornos naturales (huecos de árboles, zanjas) como de recipientes artificiales (floreros, gomas, bebederos), utilizando cucharones, redes de acuario con malla fina, pipetas y sifones. La colecta se efectuó en sitios distintos dentro de una misma localidad y el número varió dependiendo de la cantidad de recipientes con agua. Todos los ejemplares en estadios inmaduros fueron criados hasta adultos en las instalaciones del Laboratorio de

Insectos Vectores del Centro de Estudios Parasitológicos y de Vectores (CEPAVE) de La Plata. Si bien en todas las localidades se intentó el muestreo de adultos, no siempre fue posible conseguir ejemplares. En los sitios donde fue posible la colocación de trampas se usaron las CDC durante uno a tres días, en el rango horario de 17 a 22 hs (Figura I.3); además, para los mosquitos diurnos se empleó la colecta sobre cebo humano con aspiradores a batería y redes. Aquellos ejemplares que no pudieron ser transportados vivos fueron criopreservados hasta su posterior procesamiento para preservar la viabilidad de los posibles flavivirus eventualmente presentes en los mosquitos. La identificación morfológica se realizó bajo un microscopio estereoscópico y sobre una platina fría utilizando claves taxonómicas dicotómicas [160]. Los ejemplares identificados fueron colocados en crioviales agrupados por especie, sexo, sitio y fecha de recolección. Cada pool fue conformado por 10 individuos en la mayoría de los casos y, cuando no fue posible llegar a ese número, el pool osciló entre 1 y 9 individuos. Las muestras se conservaron a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta su procesamiento.



**Figura I.2.** Ovitrapas colocadas en el vivero del zoológico de La Plata (Buenos Aires).



**Figura I.3.** Colocación de trampas CDC (izquierda) y recolección de adultos con aspiradores y jaulas (derecha).

### I.2.3. Detección de flavivirus y NIRVS

#### I.2.3.1. Extracción de ácidos nucleicos

Para llevar a cabo la detección de ácidos nucleicos de origen viral, se procedió con la extracción total del ARN y el ADN de las muestras utilizando TRI REAGENT® (Molecular Research Centre Inc., Ohio, EE.UU.). Primero, cada pool de mosquito se maceró en hielo utilizando un pestle estéril en 150 µl de tampón fosfato salino. Se agregaron 800 µl de TRI REAGENT, se agitó con vórtex durante 3 a 5 segundos y se dejó reposar 5 min en hielo. Sucesivamente se agregaron 200 µl de cloroformo (4 °C) y se agitó nuevamente durante 15 segundos para luego dejar reposar la muestra 5 min a temperatura ambiente y luego se centrifugó a 13200 rpm durante 15 min a 4 °C. A partir de este momento se prosiguió por separado con la extracción de ARN y la de ADN. Para la extracción de ARN se recuperó la fase acuosa y se la trasladó en un nuevo tubo, dejando la fase orgánica para la extracción de ADN. Se agregaron 500 µl de isopropanol (4 °C) y se mezcló por inversión. La muestra fue incubada durante 10 min a temperatura ambiente y sucesivamente centrifugada a 13200 rpm durante 10 min a 4 °C. El sobrenadante se descartó cuidadosamente por inversión, se agregaron 800 µl de etanol 70 % (4 °C) seguidos de un spin de centrifuga. El sobrenadante se descartó con pipeta y se dejó secar el precipitado a temperatura ambiente. Finalmente se añadieron 20 µl de agua despirogenada libre de ARNasa y se agitó suavemente para favorecer la re-suspensión de ARN. Sucesivamente se procedió con la retrotranscripción de la muestra o con su almacenamiento a -70 °C.

Para la extracción de ADN, se agregaron 240 µl de etanol puro a la muestra inicial (fase orgánica, sin fase acuosa) y se mezcló por inversión. La muestra se incubó a temperatura ambiente durante 2-3 min y se centrifugó a 2000 g a 4 °C por 5 min. Se descartó el sobrenadante y se procedió con el lavado del ADN. Para el lavado, el pellet se resuspendió en 800 µl de citrato de sodio (0.1 M en 10 % etanol, pH 8.5). La muestra se incubó durante 30 min y se mezcló ocasionalmente por inversión. Se centrifugó a 2000 g a 4 °C por 5 min y se descartó nuevamente el sobrenadante. El lavado se repitió una vez. El pellet se resuspendió en 1,2 ml de etanol 75 % y la muestra se incubó durante 10-20 min a temperatura ambiente. Sucesivamente se centrifugó una vez más a 2000 g a 4 °C por 5 min, se descartó lo más posible el sobrenadante y se secó completamente el ADN durante 5 min a 45 °C en un baño térmico. Sucesivamente se rehidrató con 35 µl de agua ultrapura libre de nucleasas.

### 1.2.3.2 Análisis del ARN

Para la detección de genoma viral en los mosquitos, se utilizó una reacción en cadena de la polimerasa anidada, tras retrotranscripción (RT-*Nested*-PCR) de la muestra, utilizando cebadores degenerados diseñados para amplificar el genoma de cualquier flavivirus presente en las muestras [161]. La región de amplificación seleccionada fue una porción del gen de la polimerasa viral (NS5) de los flavivirus, por ser una de las zonas más conservadas, lo cual permitió el uso de una PCR genérica. La técnica consiste en una primera reacción de RT-PCR (1° ronda) en la cual el ARN viral se transforma en ADN complementario (ADNc) mediante transcripción reversa (M-MLV Transcripta; PB-L Productos Bio-Lógicos, Quilmes, Argentina) y posteriormente se amplifica el ADNc mediante PCR. El producto de amplificación de la primera PCR se usa como molde en una segunda reacción de amplificación (2° ronda) en la que los cebadores empleados se unen a una región interna del producto de la primera amplificación. Con esto se aumenta la especificidad y sensibilidad de la técnica. La PCR se llevó a cabo usando GoTaq® Master Mix (Promega) con los cebadores Flavi1+ y Flavi1- (1° ronda, 1385 bp) y Flavi2+ y Flavi2- (2° ronda, 143 bp). Como control positivo se utilizó un clon recombinante que contenía un segmento del gen codificante para la poliedrina del baculovirus AgMNPV (poliedrosis nuclear múltiple de *Anticarsia gemmatalis*) flanqueado por los cebadores de la 1° y 2° ronda (Figura 1.4), diseñado por el Dr. Ghiringhelli (Universidad Nacional de Quilmes) y clonado en el laboratorio de biología molecular del CEPAVE. Como control negativo se usó agua destilada. Los productos de amplificación finales (2° ronda, 143 bp) se corrieron en gel de agarosa 2 % con bromuro de etidio, y fueron sucesivamente purificados, secuenciados y analizados usando BLAST (megablast) contra la base de datos de nucleótidos del NCBI. Ya que no fue posible obtener un producto en la 1° ronda de PCR de buena calidad para secuenciar, las muestras positivas fueron reexaminadas con una única PCR en la cual se utilizaron como cebadores Flavi2+ y Flavi1- con el objetivo de obtener una secuencia más larga (tamaño: 260 bp).

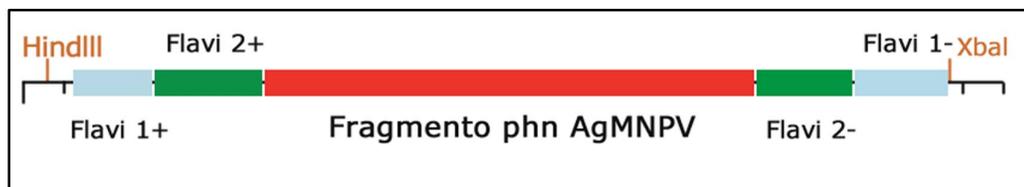


Figura 1.4. Esquema del control positivo basado sobre un gen que codifica la poliedrina del baculovirus AgMPV.

### 1.2.3.3. Análisis de ADN

Para la detección de NIRVS en el genoma de los mosquitos, se llevó a cabo una PCR en la que se utilizaron inicialmente los cebadores Flavi2+ y Flavi1- (ya que resultó ser la combinación más conveniente en el análisis de ARN), y se procedió a secuenciar los productos de amplificación positivos (en las mismas condiciones que se describen en la sección anterior). A partir de los resultados obtenidos en un análisis de BLAST para la detección de las secuencias genéticamente más cercanas (que incluyeron una secuencia de ADN similar a la NS5 flaviviral en la secuencia genómica de *Ae. aegypti* AY347953.2) y otras secuencias obtenidas de GenBank (Instituto Nacional de Salud, Bethesda, MD, EE.UU.), se desarrolló una nueva PCR dirigida a la región NS5 del genoma de flavivirus y se utilizó para analizar la fracción genómica de ADN de las extracciones de los mosquitos (Figura 1.5). Los nuevos cebadores (F540 + y F1930 -; tamaño esperado: 1402 bp) fueron diseñados sobre la base de alineamientos que incluían secuencias genómicas de *Ae. aegypti* y secuencias NS5 tanto de MBV como de ISFGA.

Finalmente, se seleccionaron muestras positivas de distintos sitios de recolección para la secuenciación, y se compararon con las secuencias más similares en bases de datos públicas (véase más adelante). Las secuencias encontradas en este trabajo han sido depositadas en la base de datos GenBank bajo los números de acceso MT863348- MT863354.

### 1.2.4. Análisis filogenéticos y de divergencia

Las secuencias de ADN de tipo flaviviral (FLDS, del inglés *Flaviviral-like DNA sequence*) obtenidas en este trabajo se analizaron junto con las secuencias de nucleótidos y aminoácidos más similares encontradas en las bases de datos de GenBank (*Nucleotide, Whole Genome Shotgun (WGS) y Transcriptome Shotgun Assembly (TSA)*), ViPr y VectorBase. Las secuencias se alinearon con el programa MUSCLE [162] y los árboles filogenéticos se construyeron bajo el método de la Máxima Verosimilitud con el programa IQ-TREE v2.1.1 [163]. La confiabilidad de los agrupamientos se evaluó con el método de *Ultrafast Bootstrap approximation* (10000 réplicas) [164] y la prueba SH-aLRT [165]. Además, se estimaron las divergencias inter-grupo e intra-grupo para las secuencias de nucleótidos y aminoácidos con el programa MEGA X [166]. El error estándar de la media (SEM) de la divergencia se evaluó mediante el método de Bootstrap (1000 réplicas).

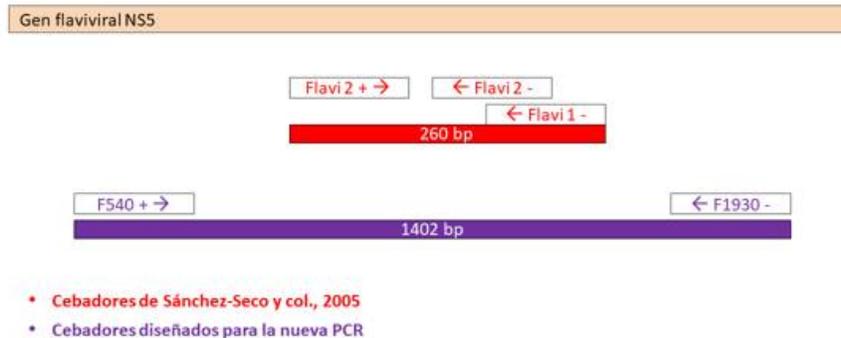
A)

Cebadores	Secuencia
Flavi 1 +	5'- GAY YTI GGI TGY GGI IGI GGI RGI TGG -3'
Flavi 1 -	5'- TCC CAI CCI GCI RTR TCR TCI GC -3'
Flavi 2 +	5'- YGY RTI YAY AWC AYS ATG GG -3'
Flavi 2 -	5'- CCA RTG ITC YKY RTT IAI RAA ICC -3'
F540 +	5'- GACACTTGGCTCACTCATAGGTCG -3'
F1930 -	5'- CTCCCAGATCGTCTCCACTTGTG -3'

B)

Cebadores	Perfil de ciclado de PCR
<p><b>Sentido: F540</b></p> <p>5' GACACTTGGCTCACTCATAGGTCG 3'</p> <hr/> <p><b>Antisentido: F1930</b></p> <p>5' CTCCCAGATCGTCTCCACTTGTG 3'</p>	<p>2 min a 94 °C, 36 ciclos de 30 seg a 94 °C, 30 seg a 56 °C, 1 min a 72 °C, y una extensión final de 5 min a 72 °C.</p>
<p><b>Tamaño del amplicón: 1402 bp</b></p>	

C)



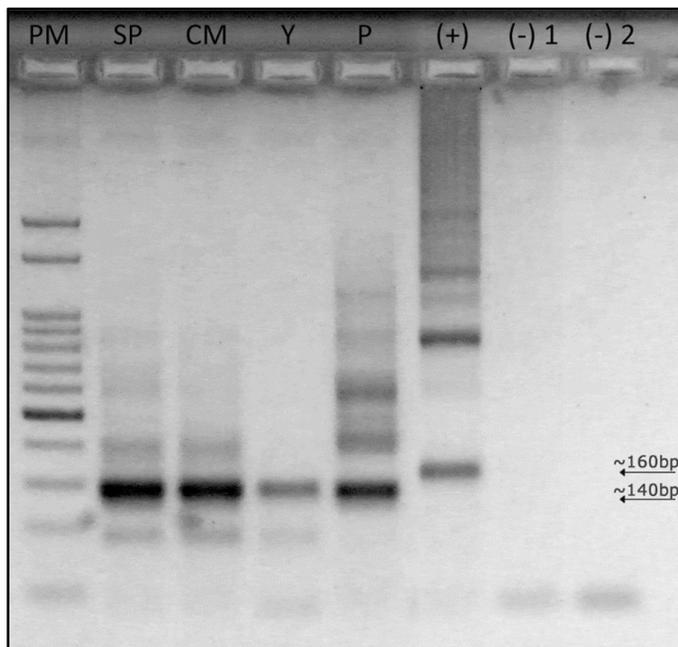
**Figura I.5.** A) La tabla muestra una lista de los cebadores utilizados y sus respectivas secuencias. B) Cebadores y condiciones de la PCR para la amplificación de la secuencia de ADN de tipo flaviviral de la región NS5. Este ensayo fue desarrollado en este trabajo de tesis. C) La figura muestra un esquema de las regiones del gen NS5 de flavivirus amplificadas por los cebadores seleccionados para este estudio.

### I.3. RESULTADOS

Para la detección de MBV e ISF fue posible muestrear 20 localidades en seis ecorregiones argentinas (Figura I.1), en las cuales se recolectaron 711 mosquitos pertenecientes a 13 especies (*Ae. aegypti*, *Ae. albopictus*, *Ae. albifasciatus*, *Ae. scapularis*, *Ae. fluviatilis*, *Culex pipiens*, *Cx. quinquefasciatus*, *Mansonia spp.*, *Coquillettidia spp.*, *Anopheles triannulatus*, *Haemagogus leucocelaenus*, *Sabethes albiprivus* y *Psorophora ferox*), divididos en 93 pools (Tabla I.1). Debido a la dificultad encontrada para recolectar adultos de *Ae. aegypti* con trampas CDC, redes o aspiradores, la mayoría de las muestras analizadas de esta especie fueron estados inmaduros (huevos, larvas, pupas).

En total, el 43 % de los pools de *Ae. aegypti* de la ecorregión Pampeana, y el 100 % de los ejemplares de la misma especie recolectados en la Selva Paranense, Campos y Malezales y las Yungas resultaron positivos para la RT-PCR en la fracción de ARN (Figura I.6). No obstante, las secuencias obtenidas no arrojaron valores de alineamientos significativos (e-valor [E] > 0,01) en el análisis BLAST (megablast) con algún MVB o ISF disponible en la base de datos de nucleótidos de GenBank, pero sí lo fueron (E < 0,01) con una FLDS integrada al genoma de *Ae. aegypti* (AY347953) y con otras secuencias cortas similares, definidas como "*Mosquito flavivirus*" (MK241696) y "*Phlebotomus flavivirus*" (FJ817075). Estos resultados sugirieron que las secuencias detectadas pudiesen tratarse de una NIRVS, y, por lo tanto, se diseñó y utilizó una nueva PCR sobre la fracción de ADN para caracterizar estas secuencias de tipo flaviviral en mosquitos y evaluar su integración. No se encontraron muestras positivas en las demás especies estudiadas.

La FLDS buscada en la fracción de ADN fue detectada en el 83 % de los pools de *Ae. aegypti* estudiados en la región Pampeana y en el 100 % de aquellos recolectados en la Selva Paranense, Campos y Malezales y las Yungas. Sin embargo, esta secuencia no fue encontrada en ninguna de las 12 especies de mosquitos restantes consideradas en este estudio. Se seleccionaron para secuenciación cinco muestras de la región Pampeana, una de Campos y Malezales y una de la Selva Paranense. La elección de estas muestras fue hecha en base a la intensidad de la banda visible en el gel de agarosa, y para representar diferentes ecorregiones y épocas de muestreo. Las muestras pertenecientes a la región de Yungas fueron excluidas del análisis bioinformático por la imposibilidad de determinar una secuencia unívoca, debido a la presencia de mezclas de amplicones. Los análisis filogenéticos mostraron que la FLDS encontrada en este estudio se agrupa con secuencias previamente descritas como integradas al genoma de *Ae. aegypti* (AY347953 y EJY57641) y también con secuencias designadas como "*Mosquito flavivirus*" o "*Phlebotomus flavivirus*" o secuencias similares de las bases de datos para especies de *Aedes* WGN y TSA (Figura I.7).



**Figura I.6. Gel de agarosa 2 %.**

Resultados de la segunda ronda de PCR sobre el ARN. PM: peso molecular (50 bp), SP: Selva Paranense, CM: Campos y Malezales, Y: Yungas, P: Pampa, (+): control positivo, (-) 1: control negativo 1ª ronda PCR, (-) 2: control negativo 2ª ronda PCR.

Las secuencias de Argentina no formaron un grupo monofilético y mostraron una divergencia intragrupo media ( $\pm$  SEM) de 0,37 % ( $\pm$  0,10 %) y 0,96 % ( $\pm$  0,29 %) para las secuencias de nucleótidos y aminoácidos, respectivamente. El grupo entero de estas FLDS mostró una divergencia intragrupo media de 0,68 % ( $\pm$  0,17 %) y 1,62 % ( $\pm$  0,33 %), para las secuencias de nucleótidos y aminoácidos, respectivamente. Además, los flavivirus específicos de insectos Xishuangbanna (KU201526) y Menghai (KX907452) fueron los más estrechamente relacionados a la secuencia, mostrando una divergencia de nucleótidos del 25,9 % ( $\pm$  1,6 %) y 27,7 % ( $\pm$  1,5 %) y una divergencia de aminoácidos del 21,1 % ( $\pm$  2,0 %) y 22,2 % ( $\pm$  2,0 %), respectivamente.

Por lo tanto, la FLDS encontrada en los ejemplares de *Ae. aegypti* de las distintas regiones biogeográficas correspondería a la misma integración previamente descrita como una NIRVS [151], y ésta muestra diferencias entre las secuencias analizadas, probablemente debido a la divergencia incorporada luego de su integración original al genoma del mosquito.

**Tabla I.1.** Vigilancia de flavivirus en distintas especies de mosquitos en cinco ecorregiones argentinas.

Especie	Localidad	Ecorregión	N Pools	N mosquitos	Estado	Detección en fracción de ARN <sup>a</sup>		Detección en fracción de ADN <sup>b</sup>	
						Positivos/ N Pools	Positivos/Total Pools (%)	Positivos/ N Pools	Positivos/Total Pools (%)
<i>Ae. aegypti</i>	La Plata	Pampa	11	105	I/A	7/11		9/11	
	Arturo Seguí		4	40	I	0/4		4/4	
	Avellaneda		6	38	I/A	5/6		6/6	
	Berazategui		3	21	I	1/3		0/3	
	La Matanza		4	40	I	0/4		4/4	
	Lomas de Zamora		4	40	I	0/4	20/47 (43%)	4/4	39/47 (83%)
	Luján		2	20	I	0/2		2/2	
	Merlo		2	20	I	2/2		2/2	
	Morón		4	30	I	4/4		3/4	
	Quilmes		3	24	I	0/3		2/3	
	Tigre		4	40	I	1/4		3/4	

	Eldorado		4	20	I	4/4		4/4	
	Puerto Iguazú	Selva Paranense	4	36	I/A	4/4	10/10 (100%)	4/4	10/10 (100%)
	San Ignacio		2	16	I	2/2		2/2	
	Santo Tomé	Campos y Malezales	2	20	I/A	2/2	2/2 (100%)	2/2	2/2 (100%)
	Tartagal	Yungas	7	43	I	7/7	7/7 (100%)	7/7	7/7 (100%)
<i>Ae. albifasciatus</i>	La Plata	Pampa	5	26	A	0/5	0/5 (0%)	0/5	0/5 (0%)
<i>Ae. albopictus</i>	Puerto Iguazú	Selva Paranense	5	34	A	0/5	0/5 (0%)	0/5	0/5 (0%)
<i>Ae. fluviatilis</i>	Puerto Iguazú	Selva Paranense	2	11	I	0/2	0/2 (0%)	0/2	0/2 (0%)
<i>Ae. scapularis</i>	Ituzaingó	Esteros del Iberá	1	4	A	0/1	0/1 (0%)	0/1	0/1 (0%)
	Guaycolec	Chaco Húmedo	1	2	A	0/1	0/1 (0%)	0/1	0/1 (0%)
<i>Cx. pipiens</i>	La Plata	Pampa	2	20	A	0/2	0/2 (0%)	0/2	0/2 (0%)
<i>Cx. quinquefasciatus</i>	Ituzaingó	Esteros del Iberá	1	1	A	0/1	0/1 (0%)	0/1	0/1 (0%)
<i>Mansonia spp.</i>	Candelaria	Campos y Malezales	2	10	A	0/2	0/2 (0%)	0/2	0/2 (0%)
<i>Coquillettidia spp.</i>	Candelaria	Campos y Malezales	2	10	A	0/2	0/2 (0%)	0/2	0/2 (0%)
<i>Sabethes albiprivus</i>	Guaycolec	Chaco Húmedo	1	5	A	0/1	0/1 (0%)	0/1	0/1 (0%)
	Posadas	Campos y Malezales	1	5	A	0/1	0/1 (0%)	0/1	0/1 (0%)

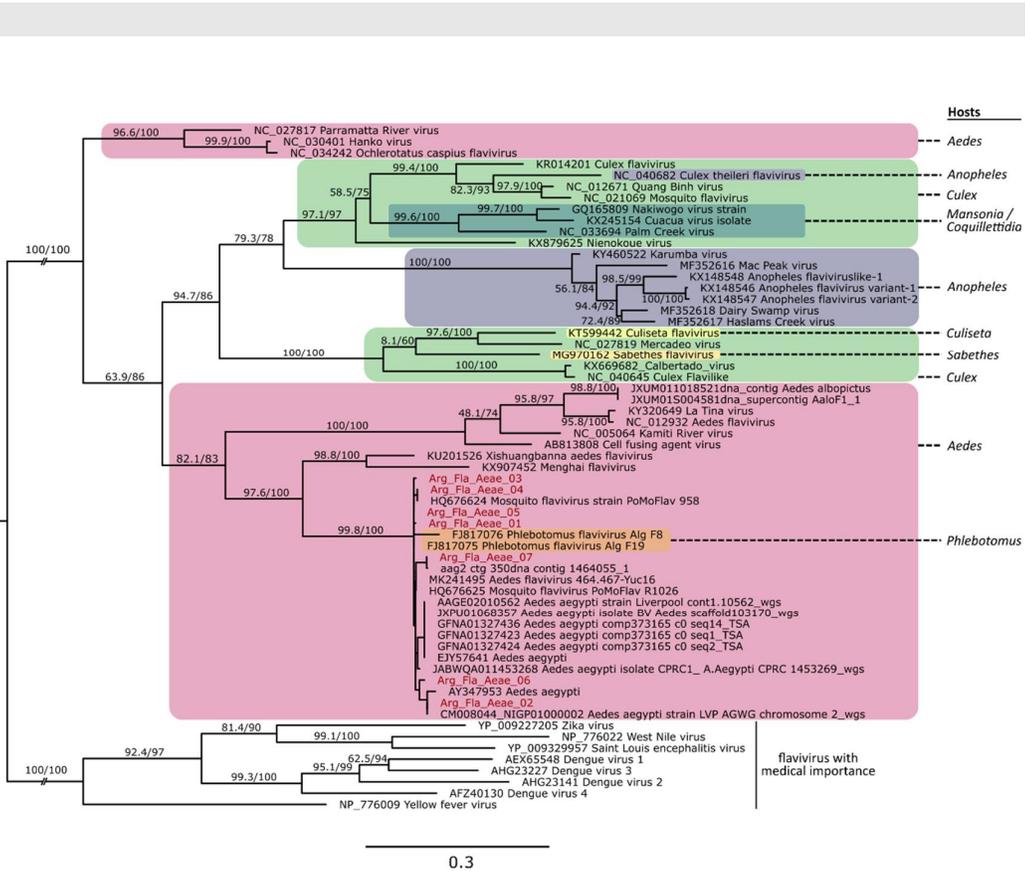
<i>Haemagogus leucocelaenus</i>	Guaycolec	Chaco Húmedo	1	6	A	0/1	0/1 (0%)	0/1	0/1 (0%)
<i>Psorophora ferox</i>	Guaycolec	Chaco Húmedo	1	7	A	0/1	0/1 (0%)	0/1	0/1 (0%)
<i>Anopheles triannulatus</i>	Guaycolec	Chaco Húmedo	1	7	A	0/1	0/1 (0%)	0/1	0/1 (0%)
	Posadas	Campos y Malezales	1	10	A	0/1	0/1 (0%)	0/1	0/1 (0%)
<b>Total</b>			<b>93</b>	<b>711</b>					

**I: Recolectados en estados inmaduros (huevo/larva/pupa)**

**A: Recolectado como adulto**

<sup>a</sup> RT-PCR genérica (Sánchez-Seco et al. 2005)

<sup>b</sup> Nueva PCR diseñada para este estudio



**Figura I.7. Análisis filogenético de flavivirus y secuencias de ADN de tipo flaviviral.** Árbol filogenético de máxima Verosimilitud (enraizado en el punto medio de la distancia) obtenido para secuencias de aminoácidos de la región NS5 del genoma de flavivirus específicos de insectos, algunos flavivirus transmitidos por mosquitos de importancia médica, y secuencias de ADN de tipo flaviviral descritas en este trabajo (en rojo). Los valores de soporte de SH-aLRT y de *Ultrafast Bootstrap approximation* superiores al 50 % se muestran en los nodos de los grupos relevantes. De las siete secuencias reportadas en este trabajo, cinco pertenecen a muestras recolectadas en Pampa, una en Campos y Malezales y una en la Selva Paranense. Las secuencias reportadas en este trabajo se indican como "Arg\_fla\_Aeae" seguido del número de muestra.

I.4. DISCUSIÓN

Los mosquitos pueden infectarse simultáneamente tanto con ISF como con arbovirus, y ha sido demostrado cómo la infección con ISF podría afectar de alguna manera la capacidad del mosquito de adquirir, mantener y transmitir arbovirus [167,168]. La vigilancia de arbovirus, especialmente en un vector importante como *Ae. aegypti*, es fundamental para comprender la circulación real de los flavivirus, prevenir brotes y estudiar las posibles interacciones entre los MBV y los ISF. Además, la detección de flavivirus en estados inmaduros del mosquito

podría sugerir la transmisión vertical como método de mantenimiento de estos virus en la naturaleza [142].

Durante este estudio se muestrearon cinco ecorregiones de Argentina, y se recolectaron mosquitos de diferentes especies. Las provincias elegidas para el muestreo son representativas de flavivirus presentes en el país (Anexo 1). En particular, en 2018, se recolectaron huevos de *Ae. aegypti* en la provincia de Salta, en el contexto del brote de ZIKV ocurrido en el mismo año entre las semanas epidemiológicas (SE) 10 y 23 [169].

Sobre los pools conformados, se estudiaron las fracciones de ARN y ADN extraídos, focalizando la atención sobre el gen que codifica la polimerasa viral (NS5) de los flavivirus, siendo ésta una de las regiones mejor conservadas entre distintos virus de este género [170]. El análisis de la fracción de ARN con una RT-PCR genérica, permitió la identificación de muestras positivas correspondientes a *Ae. aegypti* de las regiones Pampeana, Campos y Malezales, Yungas, y Selva Paranense. Sin embargo, el análisis genómico de la secuencia detectada en estas muestras no arrojó coincidencias con ningún flavivirus de interés sanitario o específico de insectos, sino más bien con secuencias cortas o integradas al genoma de mosquitos, lo que hizo pensar en una posible integración en el genoma de las poblaciones de *Ae. aegypti* estudiadas [150,151], como fue demostrado anteriormente para distintas especies del género *Aedes*.

La ausencia de flavivirus de importancia médica podría deberse a los bajos tamaños de muestra para la mayoría de las especies consideradas y a que muchos de los ejemplares examinados, especialmente *Ae. aegypti*, se recolectaron en la etapa inmadura de desarrollo (huevos, larvas o pupas) debido a la dificultad para recolectar muestras de adultos. También, el muestreo coincidió con un período inter-epidémico de dengue (2017-2019), mientras que las mayores epidemias de esta enfermedad en Argentina ocurrieron en 2016 y 2020 (58889 casos, 40,5 % más que en la temporada 2015-2016)[171], y los brotes de Zika entre 2016 y 2018 en las provincias de Chaco, Formosa, Tucumán y Salta [169].

Todos los arbovirus patógenos para los humanos se mantienen principalmente en ciclos zoonóticos [15] y, si bien la TV natural de DENV, WNV, ZIKV y YFV fue demostrada en especies de *Aedes*, *Culex* y *Haemagogus*, los porcentajes de estas transmisiones naturales son muy bajos [37,172–175]. Por otro lado, debido a la falta de evidencia de replicación de ISF en células de vertebrados, es probable que la TV sea más eficaz en estos virus. De hecho, se ha encontrado evidencia de TV de CFAV, KRV, y AeFV tanto en colonias de mosquitos como en poblaciones de campo en distintas especies de *Culex* y *Aedes* [117,122,133,143,144,176]. Sin embargo, a pesar de que se han aislado cepas de CxFV en cuatro especies diferentes de *Culex* en Argentina, y que se han descrito secuencias similares a las de KRV en la región [30,125],

en este estudio no pudimos detectar ISF en ninguno de los pools analizados, ni demostrar su TV.

Por otro lado, a partir de los resultados obtenidos tras el estudio de la fracción de ARN extraído de los pools, se procedió con el desarrollo de una nueva PCR para analizar la fracción de ADN. Este análisis condujo a la descripción de una secuencia de ADN de tipo flaviviral (FLDS), presente en los mosquitos de la especie *Ae. aegypti* recolectados en todas las ecorregiones muestreadas.

Este elemento genético ha sido caracterizado previamente en *Ae. aegypti* (líneas celulares A20 y Aag2) y en mosquitos de otras regiones geográficas, como Guayana Francesa, Senegal y Tailandia [150,151]. Estudios previos demostraron que esta FLDS está integrada en el genoma de *Ae. aegypti*, que se transcribe constitutivamente en líneas celulares y en algunas poblaciones de mosquitos, y que, aparentemente, no se expresa [151]. La misma secuencia fue encontrada en el neurotranscriptoma de la cepa Liverpool de *Ae. aegypti* [177] y se demostró que los niveles de transcripción no se vieron afectados por la infección experimental con DENV-1 o DENV-3 [151]. La FLDS es considerada un elemento ancestral en el genoma de *Ae. aegypti*, lo que también se refleja en la diversidad de las secuencias obtenidas en este trabajo. La evidencia actual indica que la integración de secuencias virales conduce a un cambio permanente y que, si dicho cambio involucra la línea germinal, luego se transfiere a la progenie y puede condicionarla a que sea más o menos susceptible a la infección con virus relacionados [178–180].

Si bien nuestros resultados muestran que la FLDS está presente en *Ae. aegypti* de diferentes ecorregiones argentinas, dicha secuencia no se encuentra en todas las muestras analizadas, posiblemente reflejando la heterogeneidad observada en las poblaciones de mosquitos de Argentina [181,182]. De hecho, en Argentina, *Ae. aegypti* pertenece a tres haplogrupos principales (y varios haplotipos) que posiblemente representan diferentes eventos de colonización [183,184]. Luego de su erradicación en 1967, *Ae. aegypti* reingresa al país en 1986 en las provincias de Misiones y Formosa, y desde entonces mostró una rápida y constante expansión hacia el sur, llegando a la región pampeana en 1991 [184–186]. Por lo tanto, las implicaciones de esta diversidad en la población de vectores merecen un estudio adicional para determinar su posible relevancia en la transmisión del virus y la integración de secuencias de ADN de tipo flaviviral.

Las NIRVS similares a flavivirus (F-NIRVS) se han descrito previamente en *Aedes spp.* y *Anopheles spp.* [149,156], y se cree que, al igual que los ISF, puedan tener un rol modulador en la infección con flavivirus. Por ejemplo, un estudio demostró cómo la ausencia de una NIRVS similar a CFAV naturalmente presente en el genoma de *Ae. aegypti* resultaba en un

incremento de la replicación de CFAV en los ovarios, posiblemente modulando la TV del virus [180].

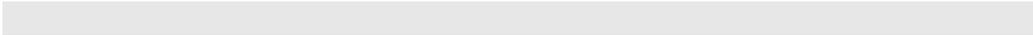
Si bien en este estudio se encontró una FLDS en *Ae. aegypti*, y que probablemente se trate de una F-NIRVS, no fue posible detectar ADN de tipo flaviviral en las otras especies de culícidos con la metodología empleada en este estudio, ni determinar su rol en la infección con flavivirus. Por último, estos resultados muestran la necesidad de profundizar los estudios para determinar la prevalencia de FLDS en las poblaciones de mosquitos en Argentina y la posible influencia del acervo genético del huésped tanto en las tasas de prevalencia de los flavivirus como en su competencia vectorial.

## I.5. CONCLUSIONES

Los mosquitos, en especial de los géneros *Aedes* y *Culex*, son los principales vectores de arbovirosis a nivel mundial. En Argentina, el flavivirus de mayor importancia sanitaria es DENV, que ha causado epidemias de gran magnitud en 2009, 2016 y 2020, seguido por ZIKV, SLEV, WNV y YFV. La vigilancia y el control de los vectores resultan fundamentales para el monitoreo y control de estas enfermedades.

En los últimos años se han detectado un gran número de ISF, un nuevo grupo de virus cuyo estudio podría contribuir a comprender mejor la evolución de los virus y los mecanismos de restricción del hospedador, como también ayudar a la prevención de la transmisión de arbovirosis.

Las medidas de control biológico para reducir la abundancia del mosquito o su competencia vectorial implican el uso de depredadores naturales, patógenos o simbiosis. Ejemplos de control biológico utilizados para los mosquitos incluyen peces larvivoros como *Gambusia affinis*, copépodos, turbelarios, y microorganismos (hongos, virus, bacterias, etc) [187]. En los últimos tiempos se han desarrollado estrategias basadas en el empleo de *Wolbachia*, endosimbiontes bacterianos heredados por la madre, presentes en muchas especies de artrópodos, que se han utilizado para reducir algunas poblaciones de insectos por medio de la incompatibilidad citoplasmática y la capacidad de bloquear la transmisión de algunos arbovirus [188–190]. Si un simbiote bacteriano puede alterar la competencia vectorial de un mosquito, ¿podrían ciertos virus, como los ISF, tener un efecto similar? La evidencia actual sugiere que algunos de estos virus pueden alterar la susceptibilidad del mosquito a ciertos arbovirus patógenos. Esta interacción aún no está completamente caracterizada y se necesitan estudios adicionales para dilucidar la dinámica de la coinfección en mosquitos.



De la misma manera, el reciente descubrimiento de F-NIRVS destaca su papel potencial como moduladoras de la competencia vectorial de los arbovirus. Su asociación con retrotransposones les permitió ser inversamente transcritas en ADN viral (vADN) y luego integrarse en el genoma de los mosquitos [191]. En algunos casos, las NIRVS se traducen en proteínas que actúan como inhibidores de la replicación viral [192]. Sin embargo, son necesarios más estudios para determinar si estas secuencias, al igual que los ISF, podrían alterar la competencia vectorial de los mosquitos una vez establecidas en el genoma del vector.

## PARTE II

### COMPETENCIA VECTORIAL DE *Aedes aegypti* PARA EL VIRUS ZIKA

---

#### II.1. INTRODUCCIÓN

##### II.1.1. Generalidades de ZIKV

El ZIKV es un arbovirus del género *Flavivirus* (familia *Flaviviridae*). El virión envuelto, de simetría icosaédrica mide aproximadamente 50 nm de diámetro, y posee una estructura genómica y un ciclo de replicación en línea con la de los demás flavivirus [193–195] (ver sección Introducción general – El género *Flavivirus*).

A pesar de estas similitudes, este virus se caracteriza por atravesar la barrera placentaria y causar infecciones en el cerebro del feto, resultando en teratogenicidad o abortos, además de presentar un particular tropismo por el sistema nervioso central y periférico, lo que lo ha convertido en un flavivirus de particular interés [196].

##### II.1.2 Historia y epidemiología de ZIKV

ZIKV fue aislado por primera vez en 1947 en el bosque de Ziika, en Uganda, a partir de un mono centinela Rhesus. Un año más tarde fue aislado en mosquitos de la especie *Aedes africanus* en el mismo bosque, sugiriendo al mosquito como posible vector del virus [197]. En 1962 se reportó el primer caso de Zika en humanos, en Uganda [198]. Fuera de África, ZIKV fue aislado por primera vez en *Ae. aegypti* en Malasia en 1966, proporcionando la primera evidencia de su transmisión a través de un vector urbano [199], seguido por infecciones en humanos reportadas en Indonesia [200]. A partir de ese momento, los casos en humanos fueron notificados solo ocasionalmente (menos de 20) en regiones de África y Asia, sin evolucionar en epidemias. Es posible que durante este período haya habido ocasionalmente casos de Zika catalogados erróneamente como otras enfermedades (por ejemplo, dengue) [201].

Recién en el año 2007, se registró el primer brote masivo en la Isla de Yap (Micronesia), donde el virus parece haberse trasladado de su hábitat selvático hacia áreas rurales, causando fiebre, erupciones, conjuntivitis y artralgia en aproximadamente el 75 % de la población

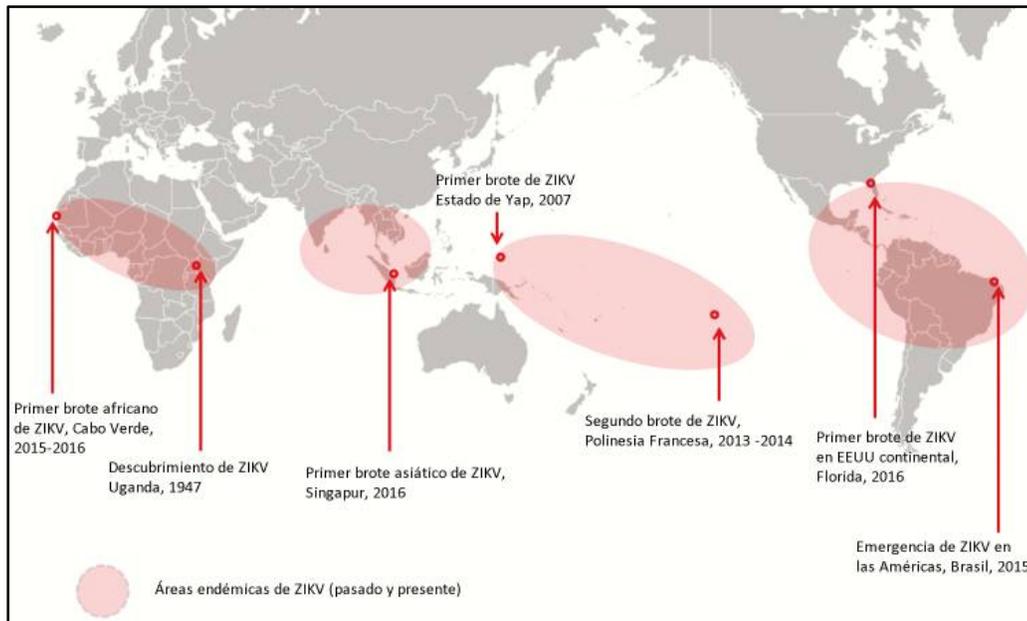
[202]. Posteriormente en 2013, un nuevo brote que resultó en más de 30000 casos sintomáticos tuvo lugar en la Polinesia Francesa afectando aproximadamente al 11 % de la población y dando lugar a la primera asociación de ZIKV con el síndrome de Guillain-Barré (SGB), la causa más frecuente de neuropatía parálitica aguda [203–205]. ZIKV fue introducido en la Isla de Pascua (Chile) por viajeros provenientes de la Polinesia Francesa, y alrededor de 50 casos fueron confirmados por el Instituto de Salud Pública de Chile durante 2014 [206].

En el continente americano el virus fue introducido en Brasil en el año 2014 [207], probablemente en el contexto de la Copa Mundial de Fútbol celebrada entre los meses de junio y julio, o incluso durante el Campeonato Mundial de Sprint celebrado en agosto del mismo año en Río de Janeiro, en el cual participaron cuatro países de la región del Pacífico [113]. Los primeros casos en pacientes fueron notificados durante los primeros meses del 2015 [208] y para finales de ese año, el virus ya se había propagado por todo el país, extendiéndose posteriormente a otros 28 países de América del Sur y América Central para febrero de 2016 [209]. El interés por el ZIKV se incrementó notoriamente a partir de la relación entre la infección por el virus y trastornos congénitos graves como la microcefalia (MC), una condición neurológica rara en la cual la cabeza tiene un tamaño menor al de otros niños de la misma edad y género, y otras malformaciones neurológicas en fetos y recién nacidos [210], especialmente en madres que contraen la infección durante el primer trimestre de embarazo [211]. Esto produjo un gran impacto no sólo en la salud de los afectados, sino también en el status socioeconómico de sus familias que, en muchos casos, se vieron forzadas a abandonar sus trabajos o actividades productivas para dedicarse al cuidado de los menores que vieron gravemente afectadas sus habilidades cognitivas y motoras como consecuencia de la MC [209].

En África, la primera epidemia de Zika se registró en Cabo Verde entre 2015-2016, aparentemente como resultado de la introducción del virus desde Brasil [212] (Figura II.1).

Antes de 2015, las infecciones por ZIKV se limitaron geográficamente a África y Asia, y las mismas eran asintomáticas o, en algunos casos (aproximadamente un 20 %) mostraba síntomas leves como erupción maculopapular, conjuntivitis y dolor articular. Los análisis genéticos del ZIKV han identificado dos linajes principales, asiático y africano [213]. Se ha propuesto que el virus se diversificó en África, dando origen a dos ramas, un linaje de África Occidental y otro de África Oriental, y posteriormente se ha agregado un tercer linaje, denominado linaje asiático. Se postula que el virus se originó en África Oriental y posteriormente migró a África Occidental y Asia, hace aproximadamente 50-100 años atrás. Los primeros análisis filogenéticos del virus en Brasil han demostrado que el virus está

estrechamente relacionado al encontrado en la Polinesia Francesa, proveniente del linaje asiático, y que desde allí el virus se ha dispersado al resto de América [214]. La evidencia de que el ZIKV cause neuropatologías y MC, así como la creciente preocupación por los nuevos modos de transmisión, sugiere un cambio evolutivo en la estructura molecular y genética de las cepas del ZIKV que ha contribuido a su rápida expansión, gravedad de patogenicidad, y múltiples rutas de infección.



**Figura II.1. Áreas endémicas de ZIKV (pasado y presente).** Adaptación de Gubler D. y col., 2017 [201].

En 2016, la Organización Mundial de la Salud (OMS) declaró que la infección por ZIKV asociada a MC y otros trastornos neurológicos constituye una emergencia de salud pública de interés internacional (PHEIC, por sus siglas en inglés *Public Health Emergency of International Concern*).

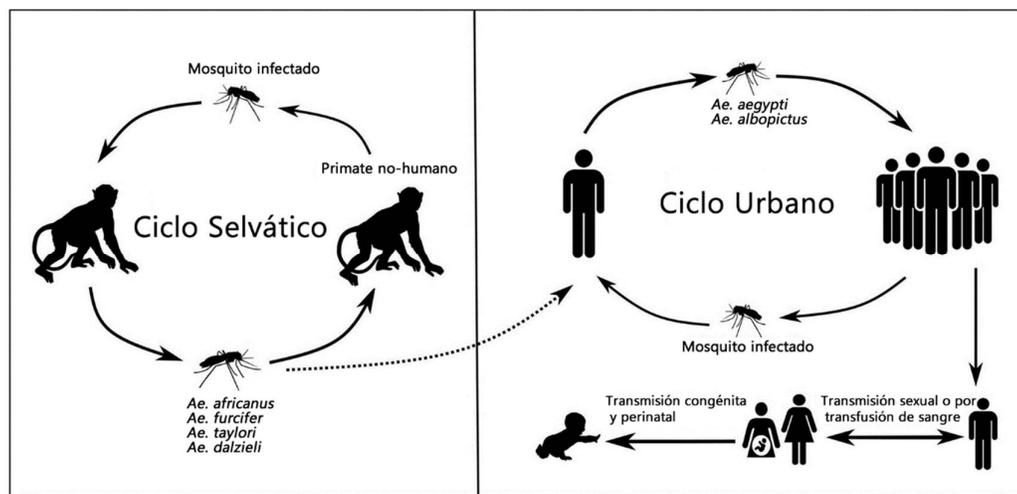
### II.1.3. Vías de transmisión del virus

Como sucede para la mayoría de los flavivirus, la principal ruta de transmisión de ZIKV es a través de la picadura de un mosquito infectado. Sin embargo, son posibles otras vías de transmisión, como la transfusión de sangre infectada, la transmisión sexual, y la transmisión materno-fetal. La transmisión sexual fue observada principalmente en viajeros provenientes de zonas endémicas [215–217]. ZIKV es el primer arbovirus en ser detectado en el semen, siendo éste un índice de potencial transmisión sexual [218]. Durante el brote en la Polinesia Francesa se sospechó la posible transmisión del virus a través de la transfusión sanguínea.

De hecho, durante dicho brote se detectó ARN viral en 2,8 % de los dadores de sangre asintomáticos [219]. Por último, también se ha observado transmisión prenatal de ZIKV en casos de abortos y MC en niños recién nacidos cuyas madres presentaban antecedentes de infección con el virus [204,220,221]. Como se mencionó anteriormente, la transmisión vertical de ZIKV de una madre infectada al feto a través de la placenta puede causar daños neurológicos en el feto en desarrollo [222].

Dos ciclos de vida distintos fueron descritos para ZIKV en la transmisión vectorial: un ciclo enzoótico (o selvático) y un ciclo epidémico (o urbano). El primero ocurre a través de mosquitos del género *Aedes* (primariamente de las especies *Ae. africanus*, *Ae. furcifer*, *Ae. taylori* y *Ae. luteocephalus*) y primates no humanos. Cuando uno de estos mosquitos infectados pica a un ser humano dentro del ciclo selvático, y este último lleva consigo el virus, se instaura el ciclo urbano, en el cual se observa la transmisión de ZIKV humano-mosquito-humano (Figura II.2) [223]. En el ciclo urbano, los humanos son los huéspedes principales y sirven como amplificadores y portadores de la infección a mosquitos no infectados.

Mosquitos pertenecientes a dieciséis especies diferentes de *Aedes* fueron encontrados infectados naturalmente a campo con ZIKV, entre las cuales se considera a *Ae. aegypti* como la especie predominante en la transmisión del virus, probablemente por su estrecha asociación con los seres humanos en las zonas urbanas [224]. Además, se detectó evidencia de transmisión vertical en especímenes de *Ae. aegypti* capturados [199,225–230], mientras que un gran número de ensayos experimentales confirmaron su capacidad de transmitir ZIKV [224,231], con diferencias en la eficiencia de transmisión atribuidas al acervo genético de la población de vectores y a la cepa viral utilizada en dichos experimentos [76,232–235].



**Figura II.2. Ciclos de transmisión vectorial de ZIKV.** (Adaptada de Sharma V. y col., 2020)[223].

#### II.1.4. Zika en Argentina

En Argentina, ZIKV fue detectado por primera vez en la provincia de Córdoba en febrero de 2016, siendo el caso atribuido a la transmisión sexual del virus. Unas semanas más tarde, el primer brote se produjo en la provincia de Tucumán, lo que dio lugar a 25 casos autóctonos confirmados. Durante octubre de 2016, se confirmó el primer caso de síndrome congénito causado por la infección con ZIKV en un recién nacido en Tucumán [236]. Durante el primer semestre de 2017, se registraron 251 casos autóctonos de Zika en Formosa, Salta y Chaco, en localidades cercanas a las fronteras de Bolivia y Paraguay (Figura II.3). Además, se detectó un caso de MC en un recién nacido en la provincia de Santa Fe. Aunque la madre no tenía registros de viaje recientes, estudios adicionales confirmaron la infección por ZIKV [236]. Curiosamente, durante 2018 la circulación ZIKV parece haberse confinado a la provincia de Salta, donde se registró un brote en los departamentos de Gral. San Martín (29 casos positivos) y Orán (25 positivos). Además, se registraron dos casos probables detectados en Salta capital. Estos casos se suman a un único caso registrado durante la SE 10 en La Matanza, provincia de Buenos Aires, sin antecedente de viaje [169,237]. Durante el 2019 se registraron solo dos casos probables de Zika en la provincia de Salta en las SE 8 y 19, los cuales fueron detectados en contexto de brote de dengue [238]. Durante el 2020 y 2021 no se han detectado casos positivos de ZIKV, si bien se mantiene la vigilancia siendo notificados todos los casos sospechosos (por síndrome congénito asociados con ZIKV) y estudiados por laboratorio [171,239].

Si bien la Argentina presentó circulación autóctona de ZIKV entre 2016 y 2018, ésta no se extendió masivamente como si lo ha hecho en otras regiones del continente. En este contexto, los estudios de vigilancia entomológica, así como los de competencia vectorial en especies de mosquitos de Argentina despiertan particular interés para entender su posible impacto en la circulación pasada o futura de este virus en el país.



**Figura II.3. Distribución de casos autóctonos de ZIKV en Argentina.** El mapa muestra las provincias argentinas con casos autóctonos de ZIKV (gris) y los países limítrofes.

## II.2. MATERIALES Y MÉTODOS

### II.2.1. Desarrollo de un alimentador artificial

Para la infección oral de las hembras de *Ae. aegypti* con ZIKV, fue necesario poner a punto un alimentador artificial que permitiera realizar los estudios de competencia vectorial de manera eficaz y segura, reproduciendo las condiciones naturales en las cuales la infección tiene lugar.

Basados en la literatura disponible y teniendo en cuenta las características más ventajosas de dos alimentadores artificiales previamente descritos (material, capacidad, tipo de membrana empleada, composición y temperatura de la ingesta sanguínea, método de regulación de la temperatura) [240,241], desarrollamos un dispositivo de alimentación que brinda seguridad y esterilidad, combinada con un sencillo armado y desarmado. Este alimentador artificial está fabricado en vidrio y tiene una capacidad de 5-6 ml, utiliza un baño térmico con circulación de agua para regular la temperatura del sistema (37 °C) y emplea como membrana tripa bovina que simula la piel. Los detalles de la puesta a punto de la metodología están descritos en el ANEXO 2.

### II.2.2. Mosquitos y cepas virales

Los mosquitos *Ae. aegypti* empleados en este estudio derivan de una colonia de laboratorio establecida en la ciudad de La Plata en la provincia de Buenos Aires (Argentina). La colonia se originó en 2014 a partir de larvas de mosquito originalmente recolectadas en el cementerio de La Plata, y desde entonces se ha mantenido en el Centro de Estudios Parasitológicos y de Vectores (CEPAVE). La introducción periódica a la colonia de mosquitos de campo de la misma zona de la ciudad se lleva a cabo estacionalmente con el fin de mantener el acervo genético lo más parecido posible a aquel de los mosquitos de campo. Para este estudio se seleccionaron dos cepas distintas de ZIKV: una cepa (ZIKV-VEN) fue aislada de un paciente que viajó de Venezuela a Argentina (cepa ARCB116141, GenBank no. MK637519), mientras que la otra cepa (ZIKV-ARG) fue aislada de un paciente en Chaco donde el virus circuló en forma autóctona en la población (cepa ARCH125797, GenBank no. MK637518). Estas cepas muestran una identidad nucleotídica del 99,5 % y una identidad aminoacídica del 100 % para un fragmento que comprende la última parte del gen codificante de la cápside (C), el gen de la membrana precursora (prM) y la primera parte del gen que codifica la envoltura (E).

El stock viral se preparó a partir de cuatro pasajes en células Vero y se conservó a  $-86\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta llevar a cabo las infecciones orales. Los títulos de cada cepa fueron determinados por ensayos de placa en placas de 12 pocillos de células Vero. El título de la cepa ZIKV-VEN fue de  $7,17\text{ log}_{10}\text{ PFU/ml}$ , mientras que el título de ZIKV-ARG fue de  $5,3\text{ log}_{10}\text{ PFU/ml}$ . Estos valores se acercan al rango de viremia en humanos notificado previamente para la infección por ZIKV [242].

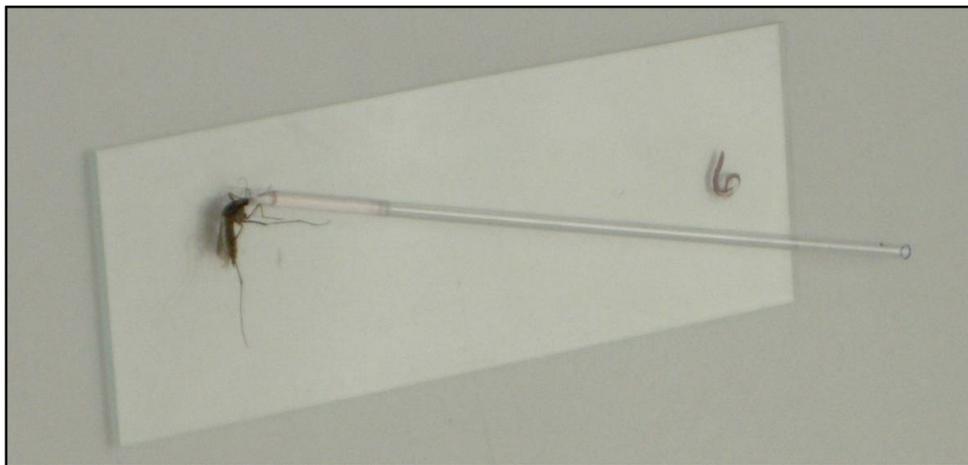
### II.2.3. Infección oral

Para la infección oral, los mosquitos fueron criados en incubadora a una temperatura de  $27 \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$  con  $70 \pm 10\%$  de humedad relativa, y un ciclo de luz:oscuridad de 16:8 horas. Tanto machos como hembras fueron criados juntos para permitir la fecundación y alimentados con agua y azúcar diariamente, excepto por un periodo de inanición de 24 hs previo a la infección oral. Luego de 4-5 días a partir de la emergencia de los adultos, los mosquitos fueron infectados a través de una alimentación sanguínea, la cual se componía de 4 ml de sangre, 0,5 ml de sacarosa 50 %, y 0,5 ml de stock viral (ZIKV). Para esta etapa se implementó el alimentador artificial previamente descrito (II.2.1), que permitió mantener la temperatura de la sangre a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Los mosquitos fueron alimentados durante una hora. Posteriormente, los ejemplares fueron colocados a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 1 min para adormecerlos. Las hembras alimentadas fueron contadas y separadas (aproximadamente entre 20 y 40 individuos por caja) en tres jaulas de cartón para ser analizadas a los 7, 11 y 14 días post-infección (DPI). Las jaulas se colocaron de nuevo en la incubadora en las mismas condiciones de temperatura y humedad hasta el momento del procesamiento de los ejemplares en los tiempos establecidos. A cada grupo se le ofreció azúcar y agua *ad libitum*. Todos los ensayos de infección se realizaron en el laboratorio de seguridad biológica de nivel 3 (BSL-3) del Instituto Nacional de Enfermedades Virales Humanas (INEVH) "Dr. Julio Maiztegui", Pergamino.

### II.2.4. Procesamiento de los mosquitos

Cada jaula de cartón con grupos de mosquitos fue seleccionada para un DPI diferente (7, 11 o 14) para poder determinar el PIE, que corresponde al tiempo entre la infección oral y la presencia de virus en la saliva. Para ello, los mosquitos fueron anestesiados irreversiblemente con trietilamina, y sucesivamente se procedió con la extracción de la saliva, y la separación de las patas del cuerpo (cabeza, alas, abdomen y tórax). Para la extracción de la saliva, la probóscide de cada mosquito inmovilizado fue colocada dentro de un tubo capilar

con 5  $\mu$ l de medio esencial mínimo (MEM) suplementado con un 20 % de suero fetal bovino inactivado (SFB) (Figura II.4). Después de 30 min de salivación, se extrajo la probóscide de los tubos capilares, y la saliva fue recolectada en un tubo *eppendorf* que contenía 300  $\mu$ l de MEM suplementado con 20 % SFB. Posteriormente, las patas fueron removidas y el resto del cuerpo colocados por separado en un tubo tipo *eppendorf* con 1 ml de MEM con 20 % de SFB, y perlas de cerámica de 1,4 mm. Todas las muestras se almacenaron a -86 °C hasta su procesamiento. Los cuerpos y las patas se homogeneizaron durante un minuto a 20 ciclos por segundo utilizando un Bead Ruptor 24 Elite (OMNI international, Kennesaw, Georgia, Usa). El homogenato resultante fue centrifugado a 5000xG durante 10 min a 4 °C. Con el fin de detectar viriones infecciosos de ZIKV, los títulos virales (para saliva, patas y cuerpos) se cuantificaron mediante la técnica titulación en placas (UFP, Unidad Formadora de Placa) de 12 wells en células Vero C76. Brevemente, diez diluciones seriadas de cada muestra en MEM suplementadas con 2 % de SFB y antibióticos se añadieron a una monocapa confluyente de células Vero C76 en placas de 12 wells, y fueron incubadas durante 1 hora agitándolas suavemente para facilitar la adsorción de virus a 37 °C. El volumen de los inóculos fue de 100  $\mu$ l en cada well. Las placas se incubaron durante 5 días a 37 °C. Seguidamente se utilizó el rojo neutro como colorante viral al 2 % para la visualización de las placas.



**Figura II.4. Salivación del mosquito.** La probóscide es colocada dentro de un tubo capilar para recolectar la saliva.

El cuerpo del mosquito fue examinado para estimar la tasa de infección (TI), las patas para estimar la tasa de diseminación (TD) y la saliva para evaluar la tasa de transmisión (TT) del virus. La TI se define como el porcentaje de mosquitos que resultaron positivos para la infección con ZIKV evaluado en el cuerpo sobre el total de las hembras alimentadas. La TD

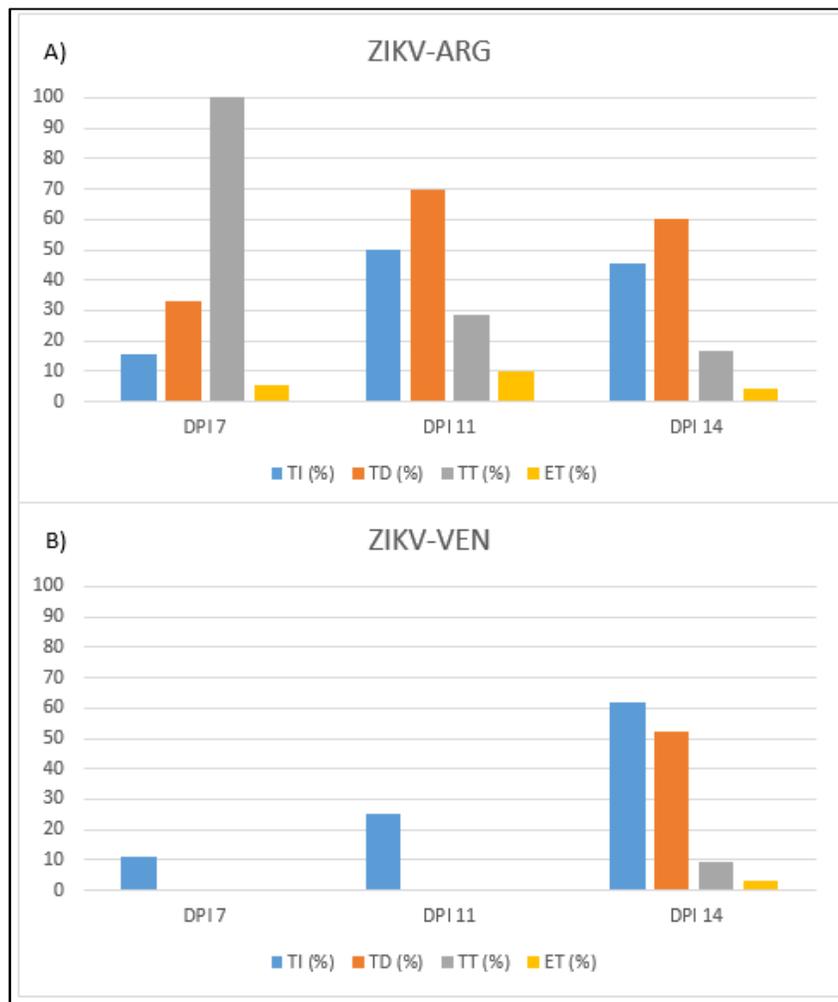
corresponde al porcentaje de mosquitos positivos para la infección en las patas sobre los mosquitos con resultados positivos para la infección en el cuerpo. La TT se define como el porcentaje de mosquitos positivos para la infección en la saliva entre los mosquitos que presentan diseminación de ZIKV. Finalmente, la eficiencia de transmisión (ET) se refiere a la proporción de mosquitos positivos para el virus en saliva sobre el total de hembras alimentadas. Las diferencias en TI, TD y TT entre las dos cepas (ZIKV-VEN y ZIKV-ARG) se compararon mediante la prueba exacta de Fisher, considerando estadísticamente significativo un valor- $p < 0,05$ . Las comparaciones de los títulos virales en el cuerpo y las patas de los mosquitos para ambas cepas se realizaron a los 14 DPI aplicando la prueba t de Student para datos con distribución normal, o la prueba de permutaciones para datos sin distribución normal. Todos los análisis se realizaron utilizando el software R (v. 3.5.0) [243–246].

### II.3. RESULTADOS

Para el estudio de la competencia vectorial se analizaron un total de 61 hembras alimentadas para evaluar la cepa ZIKV-ARG, y 60 para la cepa ZIKV-VEN (Tabla II.1). Las dos cepas infectaron los mosquitos en todos los DPI, con TI que variaron entre 11,1 % y 61,8 %. La diseminación del virus se encontró en todos los DPI ensayados para la cepa ZIKV-ARG (60,9 % de los individuos infectados), mientras que en el caso de la cepa ZIKV-VEN, la diseminación sólo se observó a los 14 DPI, lo que resultó en una TD total del 44,0 %. Finalmente, se observó la presencia de ZIKV en la saliva de un bajo número de mosquitos tanto en la cepa argentina (4 mosquitos sobre los 14 con diseminación) como en la venezolana (1 mosquito sobre los 11 con diseminación). Para la cepa ZIKV-ARG fue posible determinar la TT en todos los DPI, mientras que para la cepa ZIKV-VEN solo fue posible a los 14 DPI (Tabla II.1 y Figura II.5). Para la cepa ZIKV-ARG se observó un PIE mínimo de 7 días, mientras que para ZIKV-VEN fue de 14 días. Por último, el total de ET fue del 6,6 % para ZIKV-ARG y del 1,7 % para ZIKV-VEN. No se detectaron diferencias significativas para la TI total ( $p$ -valor = 0,71), TD ( $p$ -valor = 0,61), TT ( $p$ -valor = 0,34) y ET ( $p$ -valor = 0,71) entre ambas cepas. El título viral en la saliva fue testeado por titulación de placa en todas las muestras, independientemente de los resultados obtenidos para TI y TD. Sin embargo, no se encontró ninguna muestra positiva de saliva allí donde la infección y la diseminación fueron negativas.

**Tabla II.1.** TI, TD, TT Y ET de ZIKV-ARG y ZIKV-VEN a los 7, 11 y 14 DPI en *Ae. aegypti* de La Plata, Argentina. No se encontraron diferencias estadísticas entre ambas cepas.

Cepa	DPI	N° ♀ alimen.	Infectados	TI (%)	Diseminados	TD (%)	Transmisores	TT (%)	ET (%)
ZIKV-ARG	7	19	3	15,8	1	33,3	1	100,0	5,25
	11	20	10	50,0	7	70,0	2	28,6	10,0
	14	22	10	45,5	6	60,0	1	16,7	4,5
	Tot	61	23	37,7	14	60,9	4	28,6	6,6
ZIKV-VEN	7	18	2	11,1	0	0,0	0	0,0	0,0
	11	8	2	25,0	0	0,0	0	0,0	0,0
	14	34	21	61,8	11	52,4	1	9,1	2,9
	Tot	60	25	41,7	11	44,0	1	9,1	1,7



**Figura II.5. Representación gráfica de los resultados obtenidos.** Se muestran las tasas de infección (TI), diseminación (TD), transmisión (TT) y la eficiencia de transmisión (ET) en los distintos DPI para la cepa ZIKV-ARG (A) y ZIKV-VEN (B).

Los títulos virales promedio del cuerpo, las patas y la saliva fueron calculados para cada DPI en ambas cepas de ZIKV (Tabla II.2). Además, se realizaron comparaciones para el cuerpo y las patas entre las cepas a los 14 DPI, según disponibilidad de datos. No hubo diferencias significativas en el cuerpo entre las cepas (prueba t de Student,  $t = -0,47$ ,  $df = 26$ ,  $p\text{-valor} = 0,64$ ). Al comparar los títulos virales en las patas, se eligió un test de permutaciones debido al bajo número de muestras. En este caso, se encontraron diferencias significativas entre las cepas, siendo los títulos virales en las patas para ZIKV-VEN más altos que los de ZIKV-ARG ( $Z = -2,04$ ,  $p\text{-valor} = 0,04$ ). Además, las comparaciones entre las patas y la saliva mostraron que los títulos virales promedio en la saliva cayeron respecto al de las patas un 8,4 % para ZIKV-ARG, y un 40,7 % para ZIKV-VEN.

**Tabla II.2. Títulos promedio en cuerpo, patas y saliva en mosquitos para cepas ZIKV de Argentina y Venezuela a cada día post-infección (DPI).**

Cepa	DPI	Título promedio en cuerpo ( $\log_{10}$ UFP/ml) $\pm$ SD (N)	Título promedio en patas ( $\log_{10}$ UFP/ml) $\pm$ SD (N)	Título promedio en saliva ( $\log_{10}$ UFP/ml) $\pm$ SD (N)
ZIKV-ARG	7	3,8 $\pm$ 0,0 (3)	1,3 (1)	1 (1)
	11	3,5 $\pm$ 1,5 (9)	1,2 $\pm$ 0,2 (7)	1,4 $\pm$ 0,1 (2)
	14	4,1 $\pm$ 1,2 (10) <sup>a</sup>	1,7 $\pm$ 0,8 (6) <sup>b</sup>	1,3 (1)
	Total	3,8 $\pm$ 1,2 (22)	1,4 $\pm$ 0,6 (14)	1,3 $\pm$ 0,2 (4)
ZIKV-VEN	7	3,4 $\pm$ 0,6 (2)	NA (0)	NA (0)
	11	5,3 $\pm$ 0,1 (2)	NA (0)	NA (0)
	14	4,3 $\pm$ 0,8 (18) <sup>a</sup>	2,5 $\pm$ 0,6 (11) <sup>b</sup>	1,5 (1)
	Total	4,3 $\pm$ 0,9 (22)	2,5 $\pm$ 0,6 (11)	1,5 (1)

NA: no aplicable.

SD: Desviación estándar (del inglés, *Standard Deviation*)

N: Número de mosquitos analizados

<sup>a</sup> no se encontraron diferencias estadísticamente significativas (test de Student,  $p > 0,05$ ).

<sup>b</sup> se encontraron diferencias estadísticamente significativas (test de permutaciones,  $p < 0,05$ ).

#### II.4. DISCUSIÓN

El brote de Zika ocurrido en Brasil en 2015 encendió una alarma a nivel internacional, especialmente cuando la microcefalia en recién nacidos y otros trastornos neurológicos fueron asociados a la infección por el virus [209]. Debido a su proximidad con Brasil y a la presencia del vector *Ae. aegypti* implicado en la transmisión del virus, en Argentina también se focalizó la atención en esta enfermedad re-emergente. Sin embargo, mientras que el

Ministerio de Salud de Brasil notificó 137.288 casos autóctonos de Zika entre el 2015 y enero de 2018, en Argentina el Ministerio de Salud reportó tan solo 278 casos autóctonos y 41 casos importados [247].

En América, tres especies de mosquitos fueron hallados infectados naturalmente por ZIKV, *Ae. albopictus* y *Haemagogus leucocelaenus* en Brasil, y *Ae. aegypti* en Brasil, Ecuador y México [175,227,230,248,249]. Por otro lado, numerosos ensayos de laboratorio de competencia vectorial que utilizaron poblaciones de *Ae. aegypti* provenientes de diversos países corroboró la capacidad de esta especie de transmitir diferentes cepas de ZIKV. Sin embargo, se demostró que la competencia vectorial varía de forma notable dependiendo, principalmente, del origen de los mosquitos, la cepa de ZIKV evaluada y el tipo de sangre utilizada durante el experimento [76,232–235,250,251]. En África, las poblaciones de mosquitos de Senegal y Nigeria fueron testeadas para 14 cepas diferentes de ZIKV, todas ellas infectaron esta especie, pero sólo dos cepas alcanzaron las glándulas salivales. En Asia, los mosquitos de Singapur fueron capaces de transmitir tres cepas de ZIKV que mostraban un PIE de 3 y 4 días. Mosquitos *Ae. aegypti* de Australia y Polinesia Francesa también fueron capaces de transmitir tres cepas diferentes de ZIKV. En Europa, por su parte, una población de *Ae. aegypti* de la isla de Madeira fue evaluada para dos cepas diferentes de ZIKV; ambas cepas infectaron a los mosquitos, pero solo una de ellas resultó ser transmisible (PIE= 9 días). Por último, también se llevaron a cabo estudios de competencia vectorial en mosquitos de México y Brasil, que fueron capaces de transmitir siete y tres cepas diferentes de ZIKV, respectivamente [252]. Estos estudios, junto con el aislamiento de ZIKV en mosquitos recolectados a campo, confirman a *Ae. aegypti* como su vector principal [224,252]. Hasta el momento, ZIKV no ha sido aún aislado a campo en ninguna especie de mosquito en Argentina, ni se han realizado estudios de competencia vectorial con cepas de ZIKV que hayan circulado en el país.

En el estudio aquí llevado a cabo se evalúa la competencia vectorial de una población de *Ae. aegypti* de la zona templada de Argentina (La Plata), para dos cepas diferentes de ZIKV pertenecientes al linaje asiático. Una cepa fue aislada de un paciente con antecedente de viaje a Venezuela (ZIKV-VEN), mientras que la otra cepa fue aislada en Chaco, Argentina, durante el brote de 2017 (ZIKV-ARG). Los resultados del estudio de competencia vectorial arrojaron que la población de *Ae. aegypti* evaluada puede infectarse con ambas cepas. A pesar de que la proporción de mosquitos infectados con estas cepas resultó relativamente alta, la tasa de transmisión se mantuvo baja para ambas cepas, así como también los títulos virales en saliva. Sin embargo, debe considerarse que, debido al bajo número de mosquitos

infectados a los 7 DPI para ambas cepas y a los 11 DPI para ZIKV-VEN, las tasas de diseminación y transmisión en estos lapsos de tiempo podrían no reflejar la susceptibilidad real de la población analizada en el estudio. Para la cepa argentina detectamos una ET total de 6,6 %, que resultó ligeramente superior a la ET total de la cepa venezolana (1,7 %). Estos datos se acercan más a la ET detectada en *Ae. aegypti* de Río de Janeiro (10 %), que a los valores de ET encontrados para otras cepas del linaje asiático de ZIKV transmitidas por las poblaciones de *Ae. aegypti* de Los Ángeles (53-75 %) [232,253]. Una posible explicación para los bajos niveles de transmisión detectados podría ser el empleo de un stock viral congelado. La dificultad para llevar a cabo el experimento con virus fresco nos lleva a preguntarnos si la susceptibilidad de las cepas podría variar según una respuesta diferente a la congelación/descongelación del virus, lo que causaría una disminución de la eficiencia de la transmisión [233,254,255].

El acervo genético del mosquito es otro factor que podría influir en la competencia vectorial [81,232,233,256]. En este sentido, las poblaciones de *Ae. aegypti* de Argentina que han sido estudiadas genéticamente presentan en su genoma una mezcla de sus dos ecoformas: la selvática, *Ae. aegypti formosus* (Aaf), y la urbana *Ae. aegypti aegypti* (Aaa) [181], situación peculiar, diferente a lo encontrado en el resto del mundo donde *Ae. aegypti* existe solamente en su ecoforma doméstica. El hecho de que las poblaciones argentinas tengan un acervo genético africano podría ser una explicación para la baja transmisión de ZIKV de estos mosquitos, ya que algunas poblaciones de *Ae. aegypti* de Senegal resultaron no ser competentes para la transmisión de este virus [257] y que recientemente se ha demostrado que las poblaciones africanas (Aaf) de *Ae. aegypti* son menos susceptibles a ZIKV respecto de las no-africanas (Aaa) [258].

La circulación de ZIKV en Argentina fue muy inferior en comparación con Brasil. Curiosamente, durante 2016, Argentina tuvo uno de los mayores brotes de dengue en magnitud y dispersión geográfica, seguido por el brote ocurrido en 2019-2020, durante el cual no se registraron casos confirmados de Zika [171,259]. En 2016, la infección por DENV se propagó a través de 15 provincias del centro y norte del país, con 41.207 casos confirmados. Esta situación podría haber afectado a la detección de la infección por ZIKV tanto desde el aspecto clínico como a nivel de los estudios serológicos (reactividad cruzada IgM) [260]. Por otro lado, en Argentina, los ensayos de laboratorio indican una alta competencia vectorial para DENV-2 por parte de poblaciones de *Ae. aegypti* de las zonas subtropicales y templadas, siendo los mosquitos de los subtrópicos aún más eficientes que los de la zona templada [261]. Además, estudios de competencia vectorial para DENV en

poblaciones genéticamente distintas de *Ae. aegypti* de Argentina (una de ellas pertenece a la misma población que usamos en este estudio), mostró una gran variabilidad en la competencia vectorial de este virus [182].

La provincia de Buenos Aires representa un ambiente propicio para la propagación de ZIKV, en cuanto es la más poblada del país, la abundancia de *Ae. aegypti* y el hecho de que se han reportado numerosos casos importados de viajeros provenientes de distintas partes del mundo [262]. Sin embargo, el Ministerio de Salud ha reportado un solo caso autóctono de ZIKV en esta provincia [169]. La ausencia de un brote de Zika en la región podría explicarse por la baja tasa de transmisión observada en la población de mosquitos estudiada en laboratorio durante esta tesis, aunque dada la complejidad de estos ciclos podrían intervenir también otros factores.

Otro factor a considerar es la presencia de las distintas barreras tisulares del intestino medio y de las glándulas salivales encontradas durante el período de incubación extrínseco, las cuales pueden influir en la diseminación y replicación del virus en los diferentes tejidos [263]. Los resultados obtenidos muestran que la disminución de los títulos en la saliva comparados con los de las patas es cuatro veces mayor en la cepa venezolana que en la argentina, aunque los títulos virales promedio fueron significativamente más altos en las patas para ZIKV-VEN que en ZIKV-ARG. Estos datos surgieron por un lado la presencia de una barrera eficaz presente en las glándulas salivales, y por otro lado que existen diferencias en el *fitness* del mosquito según la cepa viral que lo infecta. Otra diferencia en el *fitness* entre ambas cepas se observa en el PIE, siendo más corto para la cepa argentina (7 días) en comparación con la cepa importada (14 días).

## II.5. CONCLUSIONES

Por un lado, desde el punto de vista viral, en este trabajo se encontraron diferencias en el *fitness* entre una cepa de circulación autóctona y una importada, aun resultando ambas transmisibles. Por otro lado, debido a la diversidad genética observada entre *Ae. aegypti* en Argentina [182], las poblaciones de mosquitos de las regiones donde ocurrieron brotes de Zika podrían ser más susceptibles a la transmisión del virus que las poblaciones de La Plata estudiadas durante esta tesis. Además, aunque la atención se centra en *Ae. aegypti*, no se excluye que otras especies de *Aedes* puedan estar involucradas en la transmisión de ZIKV, especialmente en otras provincias afectadas por el brote con una mayor diversidad de especies de mosquitos del género *Aedes* que Buenos Aires [264].

Otro factor que debe tenerse en cuenta es que los virus de ARN replican con baja fidelidad de copia resultando en altas tasas de mutación. Si estos cambios genéticos son capaces de generar nuevas variantes, podría haber variabilidad en el *fitness* epidemiológico y, por lo tanto, podría tener un impacto en la competencia vectorial [18,265]. Evidencia de la importancia de las mutaciones en arbovirus es proporcionada por CHIKV, que se adaptó al vector *Ae. albopictus* después de una sola mutación adaptativa [266], y WNV que con la sustitución de un solo aminoácido se volvió resistente a la licorina, un inhibidor natural de los flavivirus [267]. Además, la propagación y la continua evolución de WNV produjeron un cambio en el fenotipo, llevándolo de atenuado a virulento en el caso del linaje 2 [268]. Por estas razones podríamos esperar que ZIKV se adapte aún más a las poblaciones locales de *Ae. aegypti*.

Además, como se mencionó anteriormente, el brote de ZIKV en Argentina fue simultáneo con uno de los mayores brotes de DENV, por lo cual son necesarios más estudios para evaluar el impacto de las co-infecciones de arbovirus en la epidemiología de estas enfermedades.

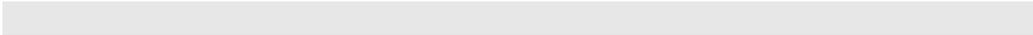
Finalmente, la vigilancia activa de las cepas circulantes y otros estudios de competencia vectorial podrían contribuir a dilucidar la dinámica del virus en la región.

## CONCLUSIONES FINALES Y PERSPECTIVAS FUTURAS

En las últimas dos décadas, tres nuevas arbovirosis han impactado en América, WNV en 1999, la emergencia de CHIKV en 2013, y la más reciente aparición y dispersión de ZIKV en 2015, representando un problema de salud pública. Estas arbovirosis se suman a los esporádicos rebrotes de fiebre amarilla silvestre ya presentes en el continente, y a dengue, principal enfermedad transmitida por mosquito. Por otro lado, las condiciones climáticas (como el aumento de las temperaturas y las precipitaciones, presentes y futuras, así como otros aspectos ambientales y demográficos representan factores de riesgo tanto para la distribución de distintos vectores como la de enfermedades a ellos relacionadas. Como las vacunas y las terapias antivirales no están aún bien establecidas para la mayoría de las enfermedades transmitidas por mosquitos, muchos de los esfuerzos están enfocados en la vigilancia viral y control de los vectores.

En este trabajo de tesis se buscó determinar las flavivirosis circulantes en los mosquitos de Argentina, tanto flavivirus patógenos para el hombre como también específicos de insectos. Estos últimos resultan de particular interés en cuanto se ha visto que pueden interferir con aspectos del *fitness* del vector. Sin embargo, no fue posible detectar ninguno de los dos tipos de virus en los mosquitos estudiados. No obstante, se detectaron secuencias de tipo flaviviral en los genomas de poblaciones de *Ae. aegypti* de distintas regiones biogeográficas de Argentina. Los estudios filogenéticos de estas secuencias demostraron que, si bien existen diferencias entre ellas, se trata de una misma secuencia previamente descrita y que podría haber acumulado mutaciones desde el primer evento de integración. Más estudios son necesarios para determinar si estas secuencias podrían tener un rol modulador en la competencia vectorial de los mosquitos, como es el caso de los ISF. Además, análisis más exhaustivos y comparativos de estas integraciones virales y distintas poblaciones geográficas de vectores, podrían esclarecer si estas secuencias son linaje-específicas, cómo se distribuyen entre las poblaciones naturales del vector, y si están activas en dichas poblaciones.

Por otro lado, los estudios de competencia vectorial de ZIKV revelaron que los mosquitos *Ae. aegypti* de la región templada de Argentina pueden transmitir el virus, aunque los resultados mostraron baja eficiencia de transmisión (lo que está en consonancia con la ausencia de brotes de importancia en la región). A su vez, cabe destacar que el brote por ZIKV en Argentina fue simultáneo con uno de los brotes por DENV más significativos del país. Por lo



tanto, serán necesarios más estudios para evaluar el impacto de las co-infecciones de arbovirus en la epidemiología de estas enfermedades.

Es interesante resaltar que, la población de mosquitos estudiada para la competencia vectorial fue la misma en la que se encontraron las secuencias de tipo flaviviral. En este sentido sería importante llevar adelante experimentos de competencia vectorial, tanto con poblaciones de mosquitos que no presenten la secuencia, como también con poblaciones de *Ae. aegypti* provenientes de las regiones donde sí hubo circulación autóctona de ZIKV, a fin de evaluar el efecto de estos factores sobre la potencial transmisión de las arbovirosis.

La continua vigilancia de los flavivirus circulantes en distintas poblaciones de mosquitos resulta de gran importancia para lograr constituir un sistema de alerta temprana que permita detectar las áreas de mayor riesgo epidemiológico y desarrollar e implementar estrategias que reduzcan el impacto de estas enfermedades emergentes y re-emergentes.

## Anexo 1

Casos notificados con sospecha de arbovirosis sin registro de antecedentes de viaje estudiados según clasificación por provincia de residencia, SE 1 a 32 de 2018.

Tabla modificada del Boletín Integrado de Vigilancia N° 418 - 2018 [169].

Provincia	Casos notificados de Arbovirosis	Dengue		Zika		SLEV		Flavivirus S/E		S	NC	D
		C	P	C	P	C	P	C	P			
<b>Buenos Aires</b>	<b>989</b>	153	125	1	0	0	1	1	1	319	233	155
<b>Corrientes</b>	<b>519</b>	15	128	0	0	0	1	0	0	87	185	103
<b>Formosa</b>	<b>423</b>	23	84	0	0	0	0	1	0	314	0	1
<b>Misiones</b>	<b>524</b>	145	9	0	0	0	0	0	0	103	195	72
<b>Salta</b>	<b>973</b>	8	14	36	20	0	0	0	4	373	391	127

### Referencias:

Flavivirus S/E= Flavivirus sin especificar

C= Confirmado

P= Probable

S= Sospechoso (casos notificados sin resultados de laboratorio)

NC= No conclusivo (casos estudiados con resultados negativos que no permiten descartar la infección)

D= Descartado

## ANEXO 2

### DESARROLLO DE UN ALIMENTADOR ARTIFICIAL

---

#### A2.1. INTRODUCCIÓN

*Aedes aegypti* es objeto de estudio en todo el mundo donde las colonias de *Ae. aegypti* están bien establecidas en insectarios [269,270]. Dado que las hembras de mosquitos necesitan alimentarse de sangre para la producción de huevos, este es un paso crítico en el mantenimiento de una colonia [271–273]. Para ello se suele emplear voluntarios humanos o animales vivos [274–278]. La implementación de animales vivos para alimentar a los mosquitos y otros insectos representa una ventaja, ya que los insectos son atraídos por algunas señales emitidas por el hospedador, como el CO<sub>2</sub> y el calor, mientras que la sangre se encuentra a la temperatura adecuada y en condiciones naturales [279,280]. Por otro lado, es más caro, requiere más espacio para criar al animal y alimentar la colonia, a menudo es desagradable y los animales necesitan ser anestesiados o inmovilizados durante la alimentación [279]. Por esta razón, es importante desarrollar un alimentador artificial eficaz que considere el bienestar de los animales y, al mismo tiempo, pueda emplearse de forma segura para experimentos de infección. Hasta el momento se han desarrollado muchas metodologías que difieren en la composición y temperatura de la sangre, el tiempo requerido para una alimentación eficiente y los aparatos empleados, los cuales se diferencian por material, tipo de membrana, capacidad y método de regulación de la temperatura [240,241,281–284]. De acuerdo con estas observaciones, y tomando en consideración los costos, la practicidad en el armado y desarmado del aparato y la esterilidad y seguridad del mismo, en este estudio proponemos un nuevo alimentador artificial que reúna las mejores características. Mediante la evaluación de los porcentajes de eclosión de los huevos, las tasas de alimentación sanguínea y el número total de huevos depositados por hembra de *Ae. aegypti*, queremos demostrar que es posible mantener una colonia con este dispositivo y que, gracias a su seguridad, también puede ser utilizado para experimentos de infección, como los estudios de competencia vectorial. Además, estos parámetros de *fitness* serán evaluados tanto para la línea parental (P) como para la línea filial (F<sub>1</sub>). De esta manera podrá también determinarse la fertilidad de la descendencia con el fin de reforzar la efectividad del aparato.

## A2.2. MATERIALES Y MÉTODOS

### A2.2.1. Desarrollo del alimentador

A través de una búsqueda bibliográfica se tomaron en consideración las mejores características de los alimentadores artificiales descritos anteriormente (Tabla A2.1), considerando el material, la capacidad, el tipo de membrana empleada, la composición y temperatura de la sangre y el método de regulación de temperatura. A partir de estos datos, desarrollamos un dispositivo de alimentación que muestra las siguientes características: bajo costo, seguridad y esterilidad, junto con un práctico montaje y desmontaje del dispositivo. La eficiencia de este aparato se midió usando tres parámetros reproductivos: eclosión de los huevos, tasa de alimentación de sangre y cantidad de huevos depositados por cada colonia.

**Tabla A2.1.** Comparación entre alimentadores artificiales previamente desarrollados.

Referencia	Material del aparato	Especie alimentada	Tasa de alimentación	Tipo de membrana	Capacidad	Temperatura	Método de regulación de la temperatura	Tiempo de exposición
Cosgrove J. y col., 1994	Aluminio	<i>Aedes aegypti</i>	67.5%	Colágeno	5 ml	35 °C	Aparato electrónico	SD
Tseng M., 2003	Parafilm M + mosquitero	<i>Aedes aegypti</i>	53%	Parafilm M	10 ml	40 °C	Paquete de sangre calentado a 40 °C en un vaso de precipitado sobre una placa caliente (una vez que se enfría no se puede volver a calentar)	30 min (dos veces en 48h)
		<i>Aedes albopictus</i>	31%					
Kasap H. y col., 2003	Vidrio	<i>Anopheles sacharovi</i>	50%	Intestino de ternero	10 ml	37 °C	Baño térmico con calentador termostático y bomba de circulación	60 min
Aldana E. y col., 2005	Vidrio	<i>Rhodnius prolixus</i> <i>Rhodnius robustus</i> <i>Triatoma maculata</i>	SD	Latex	2 ml	37 °C	Calentador de agua de precisión	SD
Costa-da-Silva A. y col., 2013	Plástico	<i>Aedes aegypti</i>	51.3%	Parafilm-M	1.5 ml	37 °C	Glicerol pre-calentado(50 °C)	30 min
Luo, Y.-P., 2014	Acrílico	<i>Aedes aegypti</i>	90.0%	Tripa de ganado/Parafilm M	SD	37 °C	Baño termostático (38.5 °C)	30 min
		<i>Aedes albopictus</i>	84.4%					
Marti G. y col., 2015	Vidrio	<i>Triatoma infestans</i>	SD	Latex	10 ml	37 °C	Baño térmico con calentador termostático y bomba de circulación	60 min

SD= Sin datos

### A2.2.2. Ensayo experimental con *Ae. aegypti*

Tres grupos parentales de cien huevos cada uno ( $P_1$ ,  $P_2$  y  $P_3$ ), recolectados de una colonia de *Ae. aegypti* establecida en el Centro de Estudios Parasitológicos y de Vectores (CEPAVE), se colocaron en una bandeja con agua de clorada y 10 mg de levadura para la eclosión. La eclosión de los huevos se registró después de 48 horas. Para alimentar las larvas se añadió a las bandejas, alimento para conejos finamente molido. Los estadios de las larvas se registraron todos los días hasta la pupación. Las pupas se contaron diariamente y se trasladaron en grupos de 3 a pequeños recipientes de plástico cubiertos con una red y llenos de agua por un cuarto hasta su emergencia. Los adultos emergidos fueron contados y sexados y posteriormente colocados en jaulas para adultos, donde fueron alimentados con pasas de uva y agua *ad libitum*. La mortalidad de los adultos se registró diariamente hasta el último ejemplar. Después de 3-5 días desde la emergencia del adulto, se ofreció a cada colonia una alimentación sanguínea (4,25 ml de sangre humana + 0,25 ml de sacarosa al 50 % p/v) una vez por semana durante 30 minutos, abarcando un período de 4-5 semanas. Para ello se utilizó el alimentador de vidrio desarrollado en este estudio. La sangre fue proporcionada por el Instituto de Hemoterapia ubicado en La Plata (Argentina), libre de infecciones (VIH, HTLV, Brucelosis, Hepatitis, Sífilis y flavivirus) y con Adenina Dextrosa Fosfato Citrato (ADPC) como anticoagulante. Para determinar la tasa de alimentación se calculó el cociente entre las hembras alimentadas y las hembras expuestas a la alimentación sanguínea. Dentro de cada jaula se colocaron un algodón húmedo y un papel de filtro en una placa de Petri para permitir la oviposición. Los huevos puestos durante cada semana se contaron y se mantuvieron en el papel de filtro dentro de una bolsa ziplock para mantener la humedad durante al menos 10 días para garantizar la embriogénesis antes de su eclosión.

### A2.2.3. Seguimiento de la generación siguiente ( $F_1$ )

De cada grupo parental, se recolectaron cien huevos y se colocaron en una bandeja con agua de clorada para su eclosión y se obtuvieron así las tres líneas filiales ( $F_{1.1}$ ,  $F_{1.2}$  y  $F_{1.3}$ ). El mismo procedimiento llevado a cabo para la línea parental se repitió para la  $F_1$ . Ambos ensayos se mantuvieron en una incubadora configurada para simular una curva de temperaturas diarias fluctuantes de acuerdo con las temperaturas medias para *Ae. aegypti* en Argentina (20-30 °C, fotoperiodo 8:16 hs de oscuridad: claridad, 70 ± 10 % HR) [285].

### A2.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Analizamos los tres parámetros reproductivos para ambas generaciones (P y F): porcentaje de eclosión de huevos, tasa de alimentación sanguínea y número total de huevos depositados por cada colonia durante toda su vida. La tasa de eclosión de huevos es equivalente al número de larvas/número de huevos y se evaluó mediante una prueba de Chi-cuadrado. La tasa general de alimentación sanguínea se calculó como  $(\text{número de hembras alimentadas}/\text{número de hembras expuestas}) \times 100 \%$ , y se evaluó mediante una prueba de Fisher [244,286].

### A2.4. RESULTADOS

Se analizaron más de 20 alimentadores artificiales, empleados normalmente para alimentar insectos hematófagos, y se tomaron en consideración siete de ellos por ser los más seguros y efectivos (Tabla A2.1). Tras un estudio exhaustivo de las ventajas y desventajas de cada característica, se diseñó un nuevo aparato resultante de la combinación de aquellos desarrollados anteriormente por Luo (2014)[240] y Marti et al. (2015)[241]. Este nuevo alimentador artificial está hecho de vidrio con una capacidad de 5-6 ml, utiliza un baño térmico que mantiene la temperatura a 37 °C, al cual se le adaptó una bomba que hace circular el agua por todo el sistema, y puede ser utilizado en serie (Figura A2.1). La sangre empleada para la alimentación es de origen humano y suplementada con sacarosa, y se coloca en la parte más interna del tubo de vidrio que se cierra con una membrana de tripa bovina. Esta membrana es fácil de almacenar a -18 °C y funcionó mejor que la de latex (datos no mostrados).

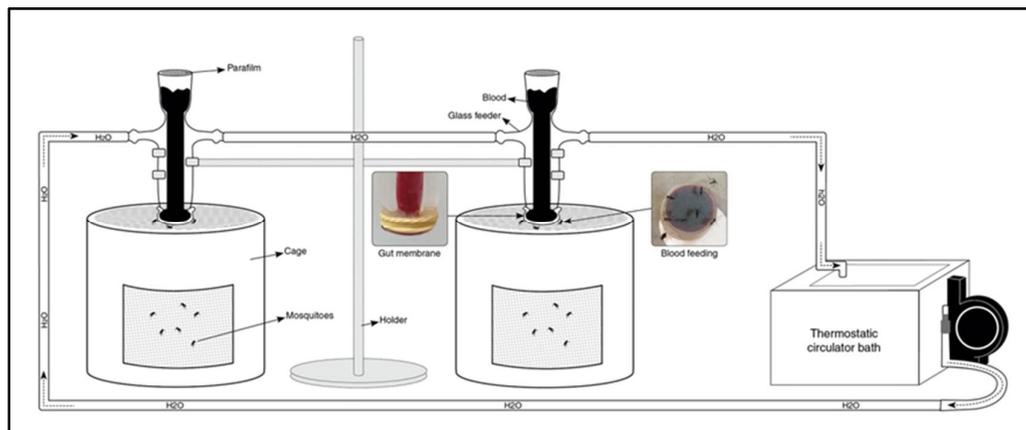


Figura A2.1. Alimentadores artificiales de vidrio conectados en serie.

El aparato diseñado se utilizó para alimentar hembras de *Ae. aegypti*, y analizar los parámetros de *fitness* que permitieron corroborar la eficacia del dispositivo. Para la línea parental (P) eclosionaron un total de 276 huevos (92 %), mientras que para la línea filial (F<sub>1</sub>) la eclosión fue de 241 huevos (80,3 %). Se encontraron diferencias significativas entre ambas generaciones (X-cuadrado = 16,16, gl = 1, valor de p = 5,81e<sup>-05</sup>). La tasa promedio de alimentación sanguínea por generación fue de 54,4 % para P y de 72,7 % para F<sub>1</sub>, y se atribuyó un promedio general del 65,6 % a todo el experimento. La tasa de alimentación sanguínea se comparó entre P y F<sub>1</sub> a lo largo de cuatro semanas, y se encontró que eran significativamente diferentes (X-cuadrado = 12,89, gl = 1, valor de p = 0,0003). La diferencia aparece solo en la primera semana (prueba de Fisher, valor p = 5.733e-8) mientras que no hay diferencias significativas en las otras semanas (Tabla A2.2).

**Tabla A2.2. Tasa de alimentacion sanguinea de hembras de *Ae. aegypti* el las líneas parental (P) y filial (F<sub>1</sub>).**

Línea	Semana	♀ Alimentadas	♀ No alimentadas	Tasa de alimentación (%)
P	1	39	44	47,0
	2	35	25	58,3
	3	12	11	52,2
	4	3	1	75,0
F <sub>1</sub>	1	87	16	84,5
	2	49	43	53,3
	3	42	26	61,8
	4	51	1	98,1

Al comienzo del experimento, la línea parental estaba constituida por 83 hembras, y el número total de huevos puestos por toda la colonia durante un período de cuatro semanas fue de 1773. La colonia de línea filial estaba compuesta por 103 hembras, que pusieron un total de 8552 huevos durante cinco semanas. El número promedio de huevos por hembra por semana fue de 5,3 para P y de 16,6 para F<sub>1</sub>.

#### A2.5. DISCUSIÓN

El objetivo del alimentador artificial de vidrio presentado, es simular de la mejor manera una alimentación natural. El aparato emplea una membrana de tripa bovina que imita la piel animal, la temperatura está regulada para mantener la sangre a 37 °C, emplea sangre humana que permite reproducir lo que sucede en la naturaleza (si bien se puede usar otro

tipo de sangre dependiendo del experimento), y es de vidrio, lo que lo hace fácilmente esterilizable. Mientras que Marti et al. (2015) [241] probaron el alimentador en triatominos y Kasap y col. (2003) [280] realizó estudios en dos especies de mosquitos del género *Anopheles*, Luo (2014) [240] limitó su estudio a la alimentación de la línea parental (P) de *Ae. aegypti* y *Aedes albopictus*, y el análisis de algunos parámetros del desarrollo de la línea filial ( $F_1$ ). En este estudio, ampliamos el análisis de los parámetros de *fitness* a la población  $F_1$  de *Ae. aegypti*, ya que este es un paso fundamental para la cría masiva de colonias. Durante el seguimiento de ambas cohortes, parental (P) y filial ( $F_1$ ), encontramos altas tasas de eclosión que están en el rango o son superiores a las mostradas en otros estudios realizados en Arabia Saudita, Georgia (EE. UU.) y Tailandia [270,278,287], mientras que en Malasia se observó un porcentaje de huevos eclosionados del 100 % [288]. El alto porcentaje de la tasa de alimentación de *Ae. aegypti* puede deberse a la naturaleza de la membrana, ya que también se muestran altos porcentajes en los trabajos presentados por Luo (2014) (89,7 %)[240] y Cosgrove y col. (1994) (67,5 %)[282] que emplean el mismo tipo de membrana. Las membranas de látex y Parafilm-M® se probaron en nuestro alimentador, pero las tasas de alimentación fueron más bajas que las obtenidas con la tripa bovina y, por lo tanto, descartadas (datos no mostrados). Además, se observó que las tasas de alimentación sanguínea permanecieron notoriamente altas durante las cuatro ofrendas de sangre a las mismas hembras durante todo el experimento. Esto enfatiza la efectividad de nuestro método de alimentación artificial. Además, el origen de la sangre empleada puede afectar las tasas de alimentación y la reproducción en colonias de *Ae. aegypti* en condiciones de laboratorio. En coincidencia con nuestros resultados, se encontraron tasas de alimentación y fertilidad más altas cuando se alimentaba a los mosquitos con sangre humana respecto a otras fuentes [289]. Finalmente, se evaluó la cantidad de huevos puestos por las hembras P y  $F_1$  durante toda su vida. El análisis del número de huevos por hembra por semana, basado en el número de hembras en la colonia al inicio del experimento, muestra que la relación entre el número de huevos en la línea filial y en la parental ( $F_1$ : P) es alrededor de 3:1. Adicionalmente, es interesante resaltar que la población  $F_1$  vivió una semana más que la parental. Se necesitan más estudios de *fitness* para evaluar si este método de alimentación podría tener un efecto sobre la longevidad de los adultos.

La principal ventaja del alimentador artificial es la sustitución de un animal vivo y la posibilidad de realizar experimentos en condiciones limpias y estériles. Además, es fácil de lavar y desinfectar, y también puede esterilizarse en autoclave. El aparato de vidrio hecho a mano cuesta alrededor de 10-12 dólares americanos, se puede usar en serie, y la membrana

intestinal bovina puede desecharse y reemplazarse a cada uso ya que es muy barata (4 metros cuesta alrededor de 8 UDS y son suficientes para 80 alimentaciones). La membrana se puede mantener a -20 °C durante un largo período de tiempo. En su conjunto, estas características hacen de este alimentador de vidrio un aparato económico, especialmente si se compara con otros métodos comercialmente disponibles que cuestan entre 100 y 300 USD. Todas estas características se vuelven muy útiles cuando se realizan experimentos que involucran patógenos. Además, utilizamos sangre humana a la que pueden adicionarse diferentes virus, como DENV, ZIKV, YFV y otros patógenos. Por tanto, el alimentador permite realizar infecciones orales y, como demostramos en este estudio, las tasas de alimentación sanguínea son muy altas (alrededor del 65,6 %) tanto para el linaje parental (P) como para el filial (F<sub>1</sub>), por lo que el alimentador de vidrio puede utilizarse, por ejemplo, para experimentos de competencia vectorial. Además, debido a su capacidad (5-6 ml) y a la alta superficie de contacto (2,5 cm ø) el aparato no solo permite la cría masiva, sino que también permite tener un elevado número de insectos expuestos a las mismas condiciones fisiológicas. Es importante destacar que durante los experimentos no se registraron derrames de sangre ni roturas de las membranas de contención.

#### A2.6. CONCLUSIONES

En conclusión, el alimentador de vidrio descrito es económico, seguro y efectivo, como lo demuestran el porcentaje de eclosión, las tasas de alimentación sanguínea y el número de huevos puestos por colonia discutidos anteriormente y, debido a que está hecho de vidrio, se puede esterilizar fácilmente en autoclave, lo que resulta fundamental en los estudios de infección con parásitos y patógenos. Por otro lado, el método, que reproduce las condiciones naturales de alimentación de los mosquitos, tiene en cuenta el bienestar de los animales eliminando el costo de su mantenimiento. Además, esta metodología permite la cría masiva de colonias garantizando el aumento del número de individuos en generaciones futuras.

## ANEXO 3

### PRODUCCIONES CIENTÍFICAS

---

Los siguientes trabajos han sido publicados a partir de las investigaciones llevadas a cabo durante esta tesis doctoral.

#### Publicaciones en revistas:

- 1) **Bonica, Melisa Berenice**; Goenaga, Silvina; Martin, María Laura; Feroci, Mariel; Luppó, Victoria; Muttis, Evangelina; Fabbri, Cintia; Morales, María Alejandra; Enria, Delia; Micieli, María Victoria; Levis, Silvana. Vector competence of *Aedes aegypti* for different strains of Zika virus in Argentina. PLOS NEGLECTED TROPICAL DISEASES; Lugar: San Francisco; Año: 2019 vol. 13
- 2) Marti, Gerardo Aníbal; **Bonica, Melisa Berenice**; Susevich, María Laura; Reynaldi, Francisco; Micieli, María Victoria; Echeverría, María Gabriela. Host range of Triatoma virus does not extend to *Aedes aegypti* and *Apis mellifera*. JOURNAL OF INVERTEBRATE PATHOLOGY; Año: 2020 vol. 173
- 3) **Bonica, Melisa Berenice**; Balcazar, Dario Emanuel; Chuchuy, Ailen; Barneche, Jorge Adrian; Torres, Carolina; Micieli, María Victoria. Detection of Flaviviral-Like DNA Sequences in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) Collected From Argentina. JOURNAL OF MEDICAL ENTOMOLOGY; Año: 2021

#### Posters presentados en Congresos/Jornadas:

- 1) **Melisa Berenice Bonica**; Silvina Goenaga; Maria Laura Martin. Vector competence of Argentinean *Aedes aegypti* population for different strains of Zika virus. 18<sup>th</sup> International Congress on Infectious diseases. Lugar: Ciudad Autónoma de Buenos Aires; Año: 2018.
- 2) **Bonica, Melisa Berenice**; Chuchuy, Ailen; Muttis, Evangelina; Goenaga, Silvina; Marti, Gerardo Aníbal; Micieli, María Victoria. Alimentador artificial para cría e infección de mosquitos. VIII Jornadas de Jóvenes Investigadores y Extensionistas. Lugar: La Plata; Año: 2019.
- 3) **Bonica, Melisa Berenice**; Chuchuy Ailen; Muttis, Evangelina; Goenaga, Silvina; Marti, Gerardo Aníbal; Micieli, María Victoria. An artificial feeder for breeding and infection of mosquitoes. LASOVE 2019. Lugar: Manaus - AM; Año: 2019.

## BIBLIOGRAFIA

1. Artsob H, Lindsay R, Drebot M. Arboviruses. International Encyclopedia of Public Health. 2nd ed. 2017. pp. 154–160. doi:10.1016/B978-0-12-803678-5.00023-0
2. Arredondo-García J, Mendez-Herrera A, Medina-Cortina H. Arbovirus en Latinoamerica. Acta Pediatr Mex. 2016;37: 111–131.
3. McGraw EA, O'Neill SL. Beyond insecticides: New thinking on an ancient problem. Nat Rev Microbiol. Nature Publishing Group; 2013;11: 181–193. doi:10.1038/nrmicro2968
4. Agboli E, Leggewie M, Altinli M, Schnettler E. Mosquito-specific viruses — Transmission and interaction. Viruses. 2019;11: 1–26. doi:10.3390/v11090873
5. García-Sastre A, Endy TP. Arboviruses. Encyclopedia of Microbiology. 3rd ed. Elsevier Inc.; 2009. pp. 313–321. doi:10.1016/b978-012373944-5.00375-8
6. Musso D, Desprès P. Serological diagnosis of flavivirus-associated human infections. Diagnostics. 2020;10: 1–13. doi:10.3390/diagnostics10050302
7. International Committee on Taxonomy of Viruses. ICTV [Internet]. 2022. Available: <https://talk.ictvonline.org/>
8. Simmonds P, Becher P, Bukh J, Gould EA, Meyers G, Monath T, et al. ICTV virus taxonomy profile: *Flaviviridae*. J Gen Virol. 2017;98: 2–3. doi:10.1099/jgv.0.000672
9. Lindenbach BD, Thiel H-J, Rice CM. Flaviviridae: the viruses and their replication. In: Knipe DM, Howley PM, editors. Fields Virology. 5th ed. Philadelphia: Lippincott-Raven; 2007. pp. 1101–1151.
10. Mukhopadhyay S, Kuhn RJ, Rossmann MG. A structural perspective of the *Flavivirus* life cycle. Nat Rev Microbiol. 2005;3: 13–22. doi:10.1038/nrmicro1067
11. Pierson TC, Diamond MS. The continued threat of emerging flaviviruses. Nat Microbiol. 2020;5: 796–812. doi:10.1038/s41564-020-0714-0
12. Fernandez-Garcia MD, Mazzon M, Jacobs M, Amara A. Pathogenesis of flavivirus infections: using and abusing the host cell. Cell Host Microbe. Elsevier Inc.; 2009;5: 318–328. doi:10.1016/j.chom.2009.04.001
13. Pierson TC, Diamond MS. Degrees of maturity: The complex structure and biology of flaviviruses. Curr Opin Virol. Elsevier B.V.; 2012;2: 168–175. doi:10.1016/j.coviro.2012.02.011
14. Kuno G, Chang GJ, Tsuchiya KR, Karabatsos N, Cropp CB. Phylogeny of the Genus

- Flavivirus. *J Virol.* 1998;72: 72–83.
15. Roundy CM, Azar SR, Rossi SL, Weaver SC, Vasilakis N. Insect-specific viruses: A historical overview and recent developments. In: Kielian M, Mettenleiter TC, Roossinck MJ, editors. *Advances in Virus Research.* 1st ed. Cambridge: Zoe Kruze; 2017. pp. 119–146. doi:10.1016/bs.aivir.2016.10.001
  16. Vasilakis N, Tesh RB. Insect-specific viruses and their potential impact on arbovirus transmission. *Curr Opin Virol.* Elsevier B.V.; 2015;15: 69–74.
  17. Sutherst RW. Global change and human vulnerability to vector-borne diseases. *Clin Microbiol Rev.* 2004;17: 136–173. doi:10.1128/CMR.17.1.136
  18. Weaver SC, Reisen WK. Present and future arboviral threats. *Antivir Res.* 2010;85: 328. doi:10.1016/j.antiviral.2009.10.008.Present
  19. Weaver SC. Urbanization and geographic expansion of zoonotic arboviral diseases: mechanisms and potential strategies for prevention. *Trends Microbiol.* Elsevier Ltd; 2013;21: 360–363. doi:10.1016/j.tim.2013.03.003
  20. Soverow JE, Wellenius GA, Fisman DN, Mittleman MA. Infectious disease in a warming world: How weather influenced West Nile virus in the United States (2001–2005). *Environ Health Perspect.* 2009;117: 1049–1052. doi:10.1289/(2009).Perspect
  21. Cleton N, Koopmans M, Reimerink J, Godeke G, Reusken C. Come fly with me: Review of clinically important arboviruses for global travelers. *J Clin Virol.* Elsevier B.V.; 2012;55: 191–203. doi:10.1016/j.jcv.2012.07.004
  22. Messina JP, Brady OJ, Scott TW, Zou C, Pigott DM, Duda KA, et al. Global spread of dengue virus types: mapping the 70 year history. *Trends Microbiol.* Elsevier Ltd; 2014;22: 138–146. doi:10.1016/j.tim.2013.12.011
  23. Romano APM, Costa ZGA, Ramos DG, Andrade MA, Jayme V de S, Almeida MAB de, et al. Yellow Fever outbreaks in unvaccinated populations, Brazil, 2008–2009. *PLoS Negl Trop Dis.* 2014;8: e2740. doi:10.1371/journal.pntd.0002740
  24. Rizzoli A, Jiménez-Clavero MA, Barzon L, Cordioli P, Figuerola J, Koraka P, et al. The challenge of West Nile virus in Europe: knowledge gaps and research priorities. *Eurosurveillance.* European Centre for Disease Control and Prevention (ECDC); 2015;20: 21135. doi:10.2807/1560-7917.ES2015.20.20.21135
  25. Fauci AS, Morens DM. Zika virus in the Americas – Yet another arbovirus threat. *N Engl J Med.* 2016;374: 601–604.
  26. Hegde S, Rasgon JL, Hughes GL. The microbiome modulates arbovirus transmission

- in mosquitoes. *Curr Opin Virol*. Elsevier B.V.; 2015;15: 97–102.  
doi:10.1016/j.coviro.2015.08.011
27. Bolling BG, Olea-poppelka FJ, Eisen L, Moore CG, Blair CD. Transmission dynamics of an insect-specific flavivirus in a naturally infected *Culex pipiens* laboratory colony and effects of co-infection on vector competence for West Nile virus. *Virology*. Elsevier Inc.; 2012;427: 90–97. doi:10.1016/j.virol.2012.02.016
  28. Kenney JL, Solberg OD, Langevin SA, Brault AC. Characterization of a novel insect-specific flavivirus from Brazil: Potential for inhibition of infection of arthropod cells with medically important flaviviruses. *J Gen Virol*. 2014;95: 2796–2808.  
doi:10.1099/vir.0.068031-0
  29. Romo H, Kenney JL, Blitvich BJ, Brault AC. Restriction of Zika virus infection and transmission in *Aedes aegypti* mediated by an insect-specific flavivirus. *Emerg Microbes Infect*. Springer US; 2018;7: 181. doi:10.1038/s41426-018-0180-4
  30. Blitvich BJ, Firth AE. Insect-specific flaviviruses: A systematic review of their discovery, host range, mode of transmission, superinfection exclusion potential and genomic organization. *Viruses*. 2015;7: 1927–1959. doi:10.3390/v7041927
  31. Wilkerson RC, Linton Y-M, Strickman D. Mosquitoes of the world (Vol. 1 and 2). 1st ed. Johns Hopkins University Press; 2021.
  32. Clements AN. Development, nutrition and reproduction. *The biology of mosquitoes*. 1st ed. London: Chapman and Hall; 1992. p. 509.
  33. Consoli RAGB, Lourenço-de-Oliveira R. Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil. Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil. 1994.  
doi:10.7476/9788575412909
  34. Clements AN. *The biology of mosquitoes*. 1st ed. London: Chapman and Hall; 1992.
  35. Lourenço-de-Oliveira R, Failloux AB. Lessons learned on Zika virus vectors. *PLoS Negl Trop Dis*. 2017;11: e0005511. doi:10.1371/journal.pntd.0005511
  36. Paupy C, Delatte H, Bagny L, Corbel V, Fontenille D. *Aedes albopictus*, an arbovirus vector: From the darkness to the light. *Microbes Infect*. Elsevier Masson SAS; 2009;11: 1177–1185. doi:10.1016/j.micinf.2009.05.005
  37. Ferreira-De-Lima VH, Lima-Camara TN. Natural vertical transmission of dengue virus in *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*: a systematic review. *Parasites and Vectors*. Parasites & Vectors; 2018;11: 77. doi:10.1186/s13071-018-2643-9
  38. Souza-Neto JA, Powell JR, Bonizzoni M. *Aedes aegypti* vector competence studies: A

- review. *Infect Genet Evol.* Elsevier; 2019;67: 191–209.  
doi:10.1016/j.meegid.2018.11.009
39. Failloux AB, Vazeille M, Rodhain F. Geographic genetic variation in populations of the dengue virus vector *Aedes aegypti*. *J Mol Evol.* 2002;55: 653–663.  
doi:10.1007/s00239-002-2360-y
  40. Powell JR, Gloria-Soria A, Kotsakiozi P. Recent history of *Aedes aegypti*: Vector genomics and epidemiology records. *Bioscience.* 2018;68: 854–860.  
doi:10.1093/biosci/biy119
  41. Failloux A. Les moustiques vecteurs d'arbovirus: une histoire sans fin. *Biol Aujourd'hui.* 2019;212: 89–99.
  42. Villegas-Trejo A, Che-Mendoza A, González-Fernández M, Guillermo-May G, González-Bejarano H, Dzul-Manzanilla F, et al. Control enfocado de *Aedes aegypti* en localidades de alto riesgo de transmisión de dengue en Morelos, México. *Salud Publica Mex.* 2011;53: 141–151. doi:10.1590/s0036-36342011000200007
  43. Rezende GL, Martins AJ, Gentile C, Farnesi LC, Pelajo-Machado M, Peixoto AA, et al. Embryonic desiccation resistance in *Aedes aegypti*: Presumptive role of the chitinized Serosal Cuticle. *BMC Dev Biol.* 2008;8: 82. doi:10.1186/1471-213X-8-82
  44. De Majo MS, Zanotti G, Campos RE, Fischer S. Effects of constant and fluctuating low temperatures on the development of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) from a temperate region. *J Med Entomol.* 2019;56: 1661–1668. doi:10.1093/jme/tjz087
  45. Raharimalala FN, Ravaomanarivo LH, Ravelonandro P, Rafaraso LS, Zouache K, Tran-Van V, et al. Biogeography of the two major arbovirus mosquito vectors, *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera, Culicidae), in Madagascar. *Parasites and Vectors.* 2012;5: 56. Available:  
<http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=L51922456%0Ahttp://dx.doi.org/10.1186/1756-3305-5-56>
  46. Adhami J, Reiter P. Introduction and establishment of *Aedes (Stegomyia) albopictus* skuse (Diptera: Culicidae) in Albania. *J Am Mosq Control Assoc.* 1998;14: 340–343.
  47. Dalla Pozza G, Majori G. First record of *Aedes albopictus* establishment in Italy. *J Am Mosq Control Assoc.* 1992;8: 318–320.
  48. Rezza G, Nicoletti L, Angelini R, Romi R, Finarelli A, Panning M, et al. Infection with chikungunya virus in Italy: an outbreak in a temperate region. *Lancet.* 2007;370: 1840–1846. doi:10.1016/S0140-6736(07)61779-6
  49. Medlock JM, Hansford KM, Schaffner F, Versteirt V, Hendrickx G, Zeller H, et al. A

- review of the invasive mosquitoes in Europe: Ecology, public health risks, and control options. *Vector-Borne Zoonotic Dis.* 2012;12: 435–447.  
doi:10.1089/vbz.2011.0814
50. Enserink M. A mosquito goes global. *Science* (80- ). 2008;320: 864–866.  
doi:10.1126/science.320.5878.864
51. Gjenero-Margan I, Aleraj B, Krajcar D, Lesnikar V, Klobučar A, Pem-Novosel I, et al. Autochthonous dengue fever in Croatia, August - September 2010. *Eurosurveillance. European Centre for Disease Control and Prevention (ECDC)*; 2011;16: 19805.  
doi:10.2807/ese.16.09.19805-en
52. La Ruche G, Souarès Y, Armengaud A, Peloux-Petiot F, Delaunay P, Desprès P, et al. First two autochthonous dengue virus infections in metropolitan France, September 2010. *Eurosurveillance. European Centre for Disease Control and Prevention (ECDC)*; 2010;15: 19676. doi:10.2807/ese.15.39.19676-en
53. Monge S, García-Ortúzar V, López Hernández B, Lopaz Pérez MÁ, Delacour-Estrella S, Sánchez-Seco MPP, et al. Characterization of the first autochthonous dengue outbreak in Spain (August–September 2018). *Acta Trop. Elsevier*; 2020;205: 105402.  
doi:10.1016/j.actatropica.2020.105402
54. Lazzarini L, Barzon L, Foglia F, Manfrin V, Pacenti M, Pavan G, et al. First autochthonous dengue outbreak in Italy, August 2020. *Eurosurveillance. European Centre for Disease Control and Prevention (ECDC)*; 2020;25: 8–11.  
doi:10.2807/1560-7917.ES.2020.25.36.2001606
55. Campos RE, Laurito M. Culicidae (Diptera) species from Argentina and Uruguay [Internet]. 2021. Available: <https://biodar.unlp.edu.ar/culicidae/>
56. Grech M, Visintin A, Laurito M, Estallo E, Lorenzo P, Roccia I, et al. New records of mosquito species (Diptera: Culicidae) from Neuquén and La Rioja provinces, Argentina. *Rev Saude Publica.* 2012;46: 387–389. doi:10.1590/S0034-89102012005000007
57. Rubio A, Cardo MV, Vezzani D, Carbajo AE. *Aedes aegypti* spreading in South America: New coldest and southernmost records. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2020;115: e190496. doi:10.1590/0074-02760190496
58. Vezzani D, Carbajo AE. *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus*, and dengue in Argentina: current knowledge and future directions. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2008;103: 66–74.  
doi:10.1590/S0074-02762008005000003
59. Schweigmann N, Vezzani D, Orellano P, Kuruc J, Boffi R. *Aedes albopictus* in an area

- of Misiones, Argentina. Rev Saude Publica. 2004;38: 136–138.
60. Goenaga S, Chuchuy A, Micieli M V., Natalini B, Kuruc J, Kowalewski M. Expansion of the distribution of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae): New records in Northern Argentina and their implications from an epidemiological perspective. J Med Entomol. 2020;57: 1310–1313. doi:10.1093/jme/tjaa009
  61. Berón CM, Campos RE, Gleiser RM, Díaz-Nieto LM, Salomón OD, Schweigmann N. Investigaciones sobre mosquitos de Argentina. 1° edición. Mar del Plata: Universidad Nacional de Mar del Plata; 2016.
  62. Diaz L, Quaglia A, Flores F, Contigiani M. Virus West Nile en Argentina: Un virus emergente. Hornero. 2011;26: 5–28.
  63. Batallán GP, Konigheim BS, Quaglia AI, Rivarola ME, Beranek MD, Tauro LB, et al. Autochthonous circulation of Saint Louis encephalitis and West Nile viruses in the Province of La Rioja, Argentina. Rev Argent Microbiol. Asociaci&acute;n Argentina de Microbiolog&iacute;a; 2021;53: 154–161. doi:10.1016/j.ram.2020.09.001
  64. Kilpatrick AM, Daszak P, Goodman SJ, Rogg H, Kramer LD, Cedeño V, et al. Predicting pathogen introduction: West Nile virus spread to Galápagos. Conserv Biol. 2006;20: 1224–1231. doi:10.1111/j.1523-1739.2006.00423.x
  65. Paz S. Climate change impacts on West Nile virus transmission in a global context. Philos Trans R Soc B Biol Sci. 2015;370: 2013561. doi:10.1098/rstb.2013.0561
  66. Davis NC. The effect of various temperatures in modifying the extrinsic incubation period of the yellow fever virus in *Aedes aegypti*. Am J Epidemiol. 1932;16: 163–176.
  67. Chan M, Johansson MA. The incubation periods of dengue viruses. PLoS One. 2012;7: e50972. doi:10.1371/journal.pone.0050972
  68. Parham PE, Michael E. Modeling the effects of weather and climate change on malaria transmission. Environ Health Perspect. 2010;118: 620–626. doi:10.1289/ehp.0901256
  69. Bhatt S, Gething PW, Brady OJ, Messina JP, Farlow AW, Moyes CL, et al. The global distribution and burden of dengue. Nature. Nature Publishing Group; 2013;496: 504–507. doi:10.1038/nature12060
  70. Valdez LD, Sibona GJ, Diaz LA, Contigiani MS, Condat CA. Effects of rainfall on *Culex* mosquito population dynamics. J Theor Biol. Elsevier Ltd; 2017;421: 28–38. doi:10.1016/j.jtbi.2017.03.024
  71. Derraik JGB, Slaney D. Anthropogenic environmental change, mosquito-borne

- diseases and human health in New Zealand. *Ecohealth*. 2007;4: 72–81.  
doi:10.1007/s10393-006-0080-2
72. Rochlin I, Faraji A, Ninivaggi D V., Barker CM, Kilpatrick AM. Anthropogenic impacts on mosquito populations in North America over the past century. *Nat Commun*. Nature Publishing Group; 2016;7: 13604. doi:10.1038/ncomms13604
73. Kilpatrick AM. Globalization, land use, and the invasion of West Nile virus. *Science* (80- ). 2011;334: 323–327. doi:10.1126/science.1201010
74. Rizzoli A, Bolzoni L, Chadwick EA, Capelli G, Montarsi F, Grisenti M, et al. Understanding West Nile virus ecology in Europe: *Culex pipiens* host feeding preference in a hotspot of virus emergence. *Parasites and Vectors*. 2015;8: 213. doi:10.1186/s13071-015-0831-4
75. Rückert C, Ebel GD. How do virus–mosquito interactions lead to viral emergence? *Trends Parasitol*. Elsevier Ltd; 2018;34: 310–321. doi:10.1016/j.pt.2017.12.004
76. Weger-Lucarelli J, Rückert C, Chotiwan N, Nguyen C, Garcia Luna SM, Fauver JR, et al. Vector competence of American mosquitoes for three strains of Zika virus. *PLoS Negl Trop Dis*. 2016;10: 1–16. doi:10.1371/journal.pntd.0005101
77. Azar SR, Roundy CM, Rossi SL, Huang JH, Leal G, Yun R, et al. Differential vector competency of *Aedes albopictus* populations from the Americas for Zika Virus. *Am J Trop Med Hyg*. 2017;97: 330–339. doi:10.4269/ajtmh.16-0969
78. Thomas RE, Wu WK, Verleye D, Rai KS. Midgut basal lamina thickness and Dengue-1 virus dissemination rates in laboratory strains of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol*. 1993;30: 326–331. doi:10.1093/jmedent/30.2.326
79. Kramer LD, Ebel GD. Dynamics of flavivirus infection in mosquitoes. *Adv Virus Res*. 2003;60: 187–232. doi:10.1016/S0065-3527(03)60006-0
80. Xiao FZ, Zhang Y, Deng YQ, He S, Xie HG, Zhou XN, et al. The effect of temperature on the extrinsic incubation period and infection rate of dengue virus serotype 2 infection in *Aedes albopictus*. *Arch Virol*. 2014;159: 3053–3057. doi:10.1007/s00705-014-2051-1
81. Fansiri T, Fontaine A, Diancourt L, Caro V, Thaisomboonsuk B, Richardson JH, et al. Genetic mapping of specific interactions between *Aedes aegypti* mosquitoes and dengue viruses. *PLoS Genet*. 2013;9: e1003621. doi:10.1371/journal.pgen.1003621
82. O’Neal ST, Samuel GH, Adelman ZN, Myles KM. Mosquito-borne viruses and suppressors of invertebrate antiviral RNA silencing. *Viruses*. 2014;6: 4314–4331. doi:10.3390/v6114314

83. Monath TP. Yellow fever: an update. *Lancet Infect Dis.* 2001;1: 11–20. doi:10.1016/S1473-3099(01)00016-0
84. Jentes ES, Pomeroy G, Gershman MD, Hill DR, Lemarchand J, Lewis RF, et al. The revised global yellow fever risk map and recommendations for vaccination, 2010: Consensus of the Informal WHO Working Group on Geographic Risk for Yellow Fever. *Lancet Infect Dis.* Elsevier Ltd; 2011;11: 622–632. doi:10.1016/S1473-3099(11)70147-5
85. States M, Stra- WHO, Group A. Vaccines and vaccination against yellow fever: WHO Position Paper — June 2013. *Wkly Epidemiol Rec = Relev épidémiologique Hebd.* 2013;88: 269–283.
86. Kirk R. An epidemic of yellow fever in the Nuba mountains, Anglo-Egyptian Sudan. *Ann Trop Med Parasitol.* 1941;35: 67–112. doi:10.1080/00034983.1941.11685115
87. Holzmann I, Agostini I, Areta JI, Ferreyra H, Beldomenico P, di Bitetti MS. Impact of yellow fever outbreaks on two howler monkey species (*Alouatta guariba clamitans* and *A. caraya*) in Misiones, Argentina. *Am J Primatol.* 2010;72: 475–480. doi:10.1002/ajp.20796
88. Goenaga S, Fabbri C, Dueñas JC, Gardenal CN, Rossi GC, Calderon GI, et al. Isolation of yellow fever virus from mosquitoes in Misiones province, Argentina. *Vector borne zoonotic Dis.* 2012;12: 986–993. doi:10.1089/vbz.2011.0730
89. Secretaria de Promoción y Programas Sanitarios - Ministerio de Salud. Boletín Integrado de Vigilancia N° 322 – SE 32 – 2016. C.A.B.A, Argentina; 2016.
90. Staples JE, Gershman M, Fischer M. Yellow Fever Vaccine; recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP) [Internet]. 2010. Available: <https://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/rr5907a1.htm>
91. Guzmán MG, Alvarez M, Rodriguez R, Rosario D, Vázquez S, Valdés L, et al. Fatal Dengue Hemorrhagic Fever in Cuba, 1997. *Int J Infect Dis.* 1999;3: 130–135.
92. Tantracheewathorn T, Tantracheewathorn S. Risk factors of dengue shock syndrome in children. *J Med Assoc Thai.* 2007;90: 272–277.
93. Díaz-Nieto LM, Maciá A, Perotti MA, Berón CM. Geographical Limits of the Southeastern Distribution of *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae) in Argentina. *PLoS Negl Trop Dis.* 2013;7: 1–6. doi:10.1371/journal.pntd.0001963
94. Rossi GC, Pascual NT, Krsticevic FJ. First record of *Aedes albopictus* (Skuse) from Argentina. *J Am Mosq Control Assoc.* 1999;15: 422.

95. Dirección Nacional de Epidemiología e Información Estratégica. Boletín Integrado de Vigilancia N° 500 – SE 24 - 2020. C.A.B.A, Argentina; 2020.
96. Petersen LR, Brault AC, Nasci RS. West Nile virus: Review of the literature. *JAMA - J Am Med Assoc.* 2013;310: 308–315. doi:10.1001/jama.2013.8042
97. Hayes EB, Komar N, Nasci RS, Montgomery SP, Leary DRO, Campbell GL. Epidemiology and transmission dynamic of West Nile virus disease. *Emerg Infect Dis.* 2005;11: 1167–1173.
98. Kramer LD, Li J, Shi PY. West Nile virus. *Lancet Neurol.* 2007;6: 171–181. doi:10.1016/S1474-4422(07)70030-3
99. Kilpatrick AM, Kramer LD, Campbell SR, Alleyne EO, Dobson AP, Daszak P. West Nile virus risk assessment and the bridge vector paradigm. *Emerg Infect Dis.* 2005;11: 425–429. doi:10.3201/eid1103.040364
100. Kilpatrick AM, Kramer LD, Jones MJ, Marra PP, Daszak P. West Nile virus epidemics in North America are driven by shifts in mosquito feeding behavior. *PLoS Biol.* 2006;4: e82. 606-610. doi:10.1371/journal.pbio.0040082
101. Morales MA, Barrandeguy M, Fabbri C, Garcia JB, Vissani A, Trono K, et al. West Nile virus isolation from equines in Argentina, 2006. *Emerg Infect Dis.* 2006;12: 1559–1561. doi:10.3201/eid1210.060852
102. Diaz LA, Komar N, Visintin A, Juri MJD, Stein M, Allende RL, et al. West Nile virus in birds, Argentina. *Emerg Infect Dis.* 2008;14: 689–691. doi:10.3201/eid1404.071257
103. Reisen WK. Epidemiology of St. Louis encephalitis virus. *Adv Virus Res.* 2003;61: 139–183.
104. Day JF. Predicting St. Louis encephalitis virus epidemics: lessons from recent, and not so recent, outbreaks. *Annu Rev Entomol.* 2001;46: 111–138.
105. Shaman J, Day JF, Stieglitz M. Drought-induced amplification of Saint Louis encephalitis virus, Florida. *Emerg Infect Dis.* 2002;8: 575–580. doi:10.3201/eid0806.010417
106. Pan American Health Organization (PAHO). Encefalitis de San Luis [Internet]. 2022. Available: [https://www3.paho.org/hq/index.php?option=com\\_content&view=article&id=8299:2013-encefalitis-san-luis&Itemid=39849&lang=en](https://www3.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=8299:2013-encefalitis-san-luis&Itemid=39849&lang=en)
107. Spinsanti LI, Díaz LA, Glatstein N, Arselán S, Morales MA, Farías AA, et al. Human outbreak of St. Louis encephalitis detected in Argentina, 2005. *J Clin Virol.* 2008;42:

- 27–33. doi:10.1016/j.jcv.2007.11.022
108. Diaz LA, Ré V, Almirón WR, Farías A, Vázquez A, Sanchez-Seco MP, et al. Genotype III Saint Louis encephalitis virus outbreak, Argentina, 2005. *Emerg Infect Dis.* 2006;12: 1752–1754. doi:10.3201/eid1211.060486
109. Diaz A, Coffey LL, Burkett-Cadena N, Day JF. Reemergence of St. Louis encephalitis virus in the Americas. *Emerg Infect Dis.* 2018;24: 2150–2157. doi:10.3201/eid2412.180372
110. Vergara Cid C, Estallo EL, Almirón WR, Contigiani MS, Spinsanti LI. Landscape determinants of Saint Louis encephalitis human infections in Córdoba city, Argentina during 2010. *Acta Trop.* 2013;125: 303–308. doi:10.1016/j.actatropica.2012.12.005
111. Chuit R, Glastein N, Ainete M, Frías M. Brote de encefalitis por flavivirus. Provincia de Córdoba (2005). *Rev Argentina Zoonosis.* 2006;3: 13–16.
112. Almirón WR, Díaz A, Spisanti L, Ré V, Visintin A, Frías A, et al. *Culex pipiens quinquefasciatus* y su relación con la encefalitis de San Luis en Córdoba, Argentina. *Rev Argentina Zoonosis.* 2006;3: 24–27.
113. Musso D. Zika virus transmission from French Polynesia to Brazil. *Emerg Infect Dis.* 2015;21: 1887.
114. Kuno G. Host range specificity of flaviviruses: Correlation with in vitro replication. *J Me.* 2007;44: 93–101.
115. Halbach R, Junglen S, van Rij RP. Mosquito-specific and mosquito-borne viruses: evolution, infection, and host defense. *Curr Opin Insect Sci.* Elsevier Inc; 2017;22: 16–27. doi:10.1016/j.cois.2017.05.004
116. Stollar V, Thomas VL. An agent in the *Aedes aegypti* cell line (Peleg) which causes fusion of *Aedes albopictus* cells. *Virology.* 1975;64: 367–377. doi:10.1016/0042-6822(75)90113-0
117. Cook S, Bennett SN, Holmes EC, De Chesse R, Moureau G, de Lamballerie X. Isolation of a new strain of the flavivirus cell fusing agent virus in a natural mosquito population from Puerto Rico. *J Gen Virol.* 2006;87: 735–748. doi:10.1099/vir.0.81475-0
118. Hoshino K, Isawa H, Tsuda Y, Sawabe K, Kobayashi M. Isolation and characterization of a new insect flavivirus from *Aedes albopictus* and *Aedes flavopictus* mosquitoes in Japan. *Virology.* Elsevier Inc.; 2009;391: 119–129. doi:10.1016/j.virol.2009.06.025
119. Espinoza-Gómez F, López-Lemus AU, Rodríguez-Sánchez IP, Martínez-Fierro ML,

- Newton-Sánchez OA, Chávez-Flores E, et al. Detection of sequences from a potentially novel strain of cell fusing agent virus in Mexican *Stegomyia (Aedes) aegypti* mosquitoes. *Arch Virol*. 2011;156: 1263–1267. doi:10.1007/s00705-011-0967-2
120. Yamanaka A, Thongrunkiat S, Ramasoota P, Konishi E. Genetic and evolutionary analysis of cell-fusing agent virus based on Thai strains isolated in 2008 and 2012. *Infect Genet Evol*. Elsevier B.V.; 2013;19: 188–194. doi:10.1016/j.meegid.2013.07.012
121. Bolling BG, Vasilakis N, Guzman H, Widen SG, Wood TG, Popov VL, et al. Insect-specific viruses detected in laboratory mosquito colonies and their potential implications for experiments evaluating arbovirus vector competence. *Am J Trop Med Hyg*. 2015;92: 422–428. doi:10.4269/ajtmh.14-0330
122. Sang RC, Gichogo A, Gachoya J, Dunster MD, Ofula V, Hunt AR, et al. Isolation of a new flavivirus related to Cell fusing agent virus (CFAV) from field-collected flood-water *Aedes* mosquitoes sampled from a dambo in central Kenya. *Arch Virol*. 2003;148: 1085–1093. doi:10.1007/s00705-003-0018-8
123. Crabtree MB, Sang RC, Stollar V, Dunster LM, Miller BR. Genetic and phenotypic characterization of the newly described insect flavivirus, Kamiti River virus. *Arch Virol*. 2003;148: 1095–1118. doi:10.1007/s00705-003-0019-7
124. Hoshino K, Isawa H, Tsuda Y, Yano K, Sasaki T, Yuda M, et al. Genetic characterization of a new insect flavivirus isolated from *Culex pipiens* mosquito in Japan. *Virology*. 2007;359: 405–414. doi:10.1016/j.virol.2006.09.039
125. Goenaga S, Fabbri CM, García JB, Rondán JC, Gardenal N, Calderón GE, et al. New strains of *Culex flavivirus* isolated in Argentina. *J Med Entomol*. 2014;51: 900–906. doi:10.1603/ME13172
126. Machado DC, Mondini A, Dos Santos Santana V, Yonamine PTK, Chiaravalloti Neto F, de Andrade Zanotto PM, et al. First identification of *Culex flavivirus* (Flaviviridae) in Brazil. *Intervirology*. 2012;55: 475–483. doi:10.1159/000337166
127. Huanyu W, Haiyan W, Shihong F, Guifang L, Hong L, Xiaoyan G, et al. Isolation and identification of a distinct strain of *Culex Flavivirus* from mosquitoes collected in Mainland China. *Virol J*. 2012;9: 73. doi:10.1186/1743-422X-9-73
128. Morales-Betoulle ME, Pineda MLM, Sosa SM, Panella N, López B MR, Cordón-Rosales C, et al. *Culex flavivirus* isolates from mosquitoes in Guatemala. *J Med Entomol*. 2008;45: 1187–1190. doi:10.1603/0022-2585(2008)45[1187:CFIFMI]2.0.CO;2

129. Farfan-Ale JA, Loroño-Pino MA, Garcia-Rejon JE, Soto V, Lin M, Staley M, et al. Detection of flaviviruses and orthobunyaviruses in mosquitoes in the Yucatan Peninsula of Mexico in 2008. *Vector borne zoonotic Dis.* 2010;10: 777–783. doi:10.1089/vbz.2009.0196
130. Chen YY, Lin JW, Fan YC, Tu WC, Chang GJJ, Chiou SS. First detection of the Africa/Caribbean/Latin American subtype of *Culex flavivirus* in Asian country, Taiwan. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* Elsevier Ltd; 2013;36: 387–396. doi:10.1016/j.cimid.2013.02.001
131. Kim DY, Guzman H, Bueno R, Dennett JA, Auguste AJ, Carrington CVF, et al. Characterization of *Culex Flavivirus* (Flaviviridae) strains isolated from mosquitoes in the United States and Trinidad. *Virology.* Elsevier Inc.; 2009;386: 154–159. doi:10.1016/j.virol.2008.12.034
132. Cook S, Moureau G, Harbach RE, Mukwaya L, Goodger K, Ssenfuka F, et al. Isolation of a novel species of flavivirus and a new strain of *Culex flavivirus* (Flaviviridae) from a natural mosquito population in Uganda. *J Gen Virol.* 2009;90: 2669–2678. doi:10.1099/vir.0.014183-0
133. Bolling BG, Eisen L, Moore CG, Blair CD. Insect-specific flaviviruses from *Culex* mosquitoes in Colorado, with evidence of vertical transmission. *Am J Trop Med Hyg.* 2011;85: 169–177. doi:10.4269/ajtmh.2011.10-0474
134. Junglen S, Kopp A, Kurth A, Pauli G, Ellerbrok H, Leendertz FH. A new flavivirus and a new vector: Characterization of a novel flavivirus isolated from *Uranotaenia* mosquitoes from a tropical rain forest. *J Virol.* 2009;83: 4462–4468. doi:10.1128/jvi.00014-09
135. Hobson-Peters J, Yam AWY, Lu JWF, Setoh YX, May FJ, Kurucz N, et al. A New Insect-Specific Flavivirus from Northern Australia Suppresses Replication of West Nile Virus and Murray Valley Encephalitis Virus in Co-infected Mosquito Cells. *PLoS One.* 2013;8: 1–12. doi:10.1371/journal.pone.0056534
136. Goenaga S, Kenney JL, Duggal NK, Delorey M, Ebel GD, Zhang B, et al. Potential for co-infection of a mosquito-specific flavivirus, Nhumirim virus, to block West Nile virus transmission in mosquitoes. *Viruses.* 2015;7: 5801–5812. doi:10.3390/v7112911
137. Schultz MJ, Frydman HM, Connor JH. Dual Insect specific virus infection limits Arbovirus replication in *Aedes* mosquito cells. *Virology.* Elsevier Inc.; 2018;518: 406–413. doi:10.1016/j.virol.2018.03.022

138. Zhang G, Asad S, Khromykh AA, Asgari S. Cell fusing agent virus and dengue virus mutually interact in *Aedes aegypti* cell lines. *Sci Rep*. Springer US; 2017;7: 6935. doi:10.1038/s41598-017-07279-5
139. Kent RJ, Crabtree MB, Miller BR. Transmission of West Nile virus by *Culex quinquefasciatus* say infected with culex flavivirus izabal. *PLoS Negl Trop Dis*. 2010; doi:10.1371/journal.pntd.0000671
140. Blitvich BJ, Magalhaes T, Laredo-Tiscareño SV, Foy BD. Sexual Transmission of Arboviruses: A Systematic Review. *Viruses*. 2020;12: 933. doi:10.3390/v12090933
141. Weaver SC, Barrett ADT. Transmission cycles, host range, evolution and emergence of arboviral disease. *Nat Rev Microbiol*. 2004;2: 789–801. doi:10.1038/nrmicro1006
142. Lequime S, Paul RE, Lambrechts L. Determinants of arbovirus vertical transmission in mosquitoes. *PLoS Pathog*. 2016;12: e1005548. doi:10.1371/journal.ppat.1005548
143. Saiyasombat R, Bolling BG, Brault AC, Bartholomay LC, Blitvich BJ. Evidence of efficient transovarial transmission of *Culex flavivirus* by *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol*. 2011;48: 1031–8. doi:10.1603/ME11043
144. Haddow AD, Guzman H, Popov VL, Wood TG, Widen SG, Haddow AD, et al. First isolation of *Aedes flavivirus* in the Western Hemisphere and evidence of vertical transmission in the mosquito *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Diptera: Culicidae). *Virology*. Elsevier; 2013;440: 134–139. doi:10.1016/j.virol.2012.12.008
145. Schopen S, Labuda M, Beaty B. Vertical and venereal transmission of California group viruses by *Aedes triseriatus* and *Culiseta inornata* mosquitoes. *Acta Virol*. 1991;35: 373–382.
146. Mourya D, Soman R. Venereal transmission of Japanese encephalitis virus in *Culex bitaeniorhynchus* mosquitoes. *Indian J Med Res*. 1999;109: 202–203.
147. Mavale MS, Geevarghese G, Ghodke YS, Fulmali P V., Singh A, Mishra AC. Vertical and venereal transmission of Chandipura Virus (Rhabdoviridae) by *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol*. 2005;42: 909–911. doi:10.1093/jmedent/42.5.909
148. Whitfield AE, Falk BW, Rotenberg D. Insect vector-mediated transmission of plant viruses. *Virology*. 2015;479–480: 278–289. doi:10.1016/j.virol.2015.03.026
149. Palatini U, Miesen P, Carballar-Lejarazu R, Ometto L, Rizzo E, Tu Z, et al. Comparative genomics shows that viral integrations are abundant and express piRNAs in the arboviral vectors *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. *BMC Genomics*. BMC Genomics; 2017;18: 512. doi:10.1186/s12864-017-3903-3

150. Crochu S, Cook S, Attoui H, Charrel RN, De Chesse R, Belhouchet M, et al. Sequences of flavivirus-related RNA viruses persist in DNA form integrated in the genome of *Aedes* spp. mosquitoes. *J Gen Virol*. 2004;85: 1971–1980. doi:10.1099/vir.0.79850-0
151. Suzuki Y, Frangeul L, Dickson LB, Blanc H, Verdier Y, Vinh J, et al. Uncovering the repertoire of endogenous flaviviral elements in *Aedes* mosquito genomes. *J Virol*. 2017;91: e00571-17. doi:10.1128/JVI.00571-17
152. Bolling BG, Weaver SC, Tesh RB, Vasilakis N. Insect-Specific Virus Discovery: Significance for the Arbovirus Community. *Viruses*. 2015;7: 4911–4928. doi:10.3390/v7092851
153. Roiz D, Vázquez A, Seco MPS, Tenorio A, Rizzoli A. Detection of novel insect flavivirus sequences integrated in *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in Northern Italy. *Virology*. 2009;6: 1–6. doi:10.1186/1743-422X-6-93
154. Fort P, Albertini A, Van-Hua A, Berthomieu A, Roche S, Delsuc F, et al. Fossil rhabdoviral sequences integrated into arthropod genomes: Ontogeny, evolution, and potential functionality. *Mol Biol Evol*. 2012;29: 381–390. doi:10.1093/molbev/msr226
155. Chen XG, Jiang X, Gu J, Xu M, Wu Y, Deng Y, et al. Genome sequence of the Asian Tiger mosquito, *Aedes albopictus*, reveals insights into its biology, genetics, and evolution. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015;112: E5907–E5915. doi:10.1073/pnas.1516410112
156. Lequime S, Lambrechts L. Discovery of flavivirus-derived endogenous viral elements in *Anopheles mosquito* genomes supports the existence of *Anopheles*-associated insect-specific flaviviruses. *Virus Evol*. 2017;3: vew035. doi:10.1093/ve/vew035
157. Whitfield ZJ, Dolan PT, Kunitomi M, Tassetto M, Seetin MG, Oh S, et al. The diversity, structure, and function of heritable adaptive immunity sequences in the *Aedes aegypti* genome. *Curr Biol*. Elsevier Ltd.; 2017;27: 3511–3519. doi:10.1016/j.cub.2017.09.067
158. Burkart R, Bárbaro NO, Sánchez RO, Gómez DA. Eco-regiones de la Argentina. Administración de Parques Nacionales, Buenos Aires, Argentina. Buenos Aires, Argentina; 1999. p. 43.
159. Bolzan A, Insua I, Pamparana C, Giner MC, Medina A, Zucchini B. Dinámica y caracterización epidemiológica del brote de dengue en Argentina año 2016: el caso de la Provincia de Buenos Aires. *Rev Chil Infectol*. 2019;36: 16–25.
160. Darsie RFJ. Mosquitoes of Argentina. Part I: Keys for identification of adult females

- and fourth stage larvae in English and Spanish (Diptera, Culicidae). *Mosq Syst.* 1985;17: 153–253.
161. Sánchez-Seco MP, Rosario D, Domingo C, Hernández L, Valdés K, Guzmán MG, et al. Generic RT-nested-PCR for detection of flaviviruses using degenerated primers and internal control followed by sequencing for specific identification. *J Virol Methods.* 2005;126: 101–109. doi:10.1016/j.jviromet.2005.01.025
  162. Edgar RC. MUSCLE: Multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res.* 2004;32: 1792–1797. doi:10.1093/nar/gkh340
  163. Minh BQ, Schmidt HA, Chernomor O, Schrempf D, Woodhams MD, Von Haeseler A, et al. IQ-TREE 2: New models and efficient methods for phylogenetic inference in the genomic era. *Mol Biol Evol.* 2020;37: 1530–1534. doi:10.1093/molbev/msaa015
  164. Hoang DT, Chernomor O, von Haeseler A, Minh BQ, Vinh LS. UFBoot2: Improving the Ultrafast Bootstrap Approximation. *Mol Biol Evol.* 2017;35: 518–522. doi:10.5281/zenodo.854445
  165. Guindon S, Dufayard JF, Lefort V, Anisimova M, Hordijk W, Gascuel O. New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: Assessing the performance of PhyML 3.0. *Syst Biol.* 2010;59: 307–321. doi:10.1093/sysbio/syq010
  166. Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K. MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Mol Biol Evol.* 2018;35: 1547–1549. doi:10.1093/molbev/msy096
  167. Öhlund P, Lundén H, Blomström AL. Insect-specific virus evolution and potential effects on vector competence. *Virus Genes.* Springer US; 2019;55: 127–137. doi:10.1007/s11262-018-01629-9
  168. Kenney JL, Brault AC. The role of environmental, virological and vector interactions in dictating biological transmission of arthropod-borne viruses by mosquitoes. In: Maramorosch K, Murphy FA, editors. *Advances in Virus Research.* 1st ed. Elsevier Inc.; 2014. pp. 39–83. doi:10.1016/B978-0-12-800172-1.00002-1
  169. Dirección de Epidemiología y Análisis de la Situación de Salud. Boletín Integrado de Vigilancia N° 418 – SE 33 - 2018 [Internet]. C.A.B.A, Argentina; 2018. Available: [https://www.argentina.gob.ar/sites/default/files/biv\\_418\\_se33.pdf](https://www.argentina.gob.ar/sites/default/files/biv_418_se33.pdf)
  170. Iacono-Connors LC, Schmaliohn CS. Cloning and sequence analysis of the genes encoding the nonstructural proteins of Langkat virus and comparative analysis with other flaviviruses. *Virology.* 1992;188: 875–880.
  171. Sistema Nacional de Vigilancia de la Salud. Boletín Integrado de Vigilancia N° 523 –

- SE 47 - 2020. C.A.B.A, Argentina; 2020.
172. Thenmozhi V, Tewari SC, Manavalan R, Balasubramanian A, Gajanana A. Natural vertical transmission of dengue viruses in *Aedes aegypti* in southern India. *Trans R Soc Trop Med Hygiene*. 2000;94: 507.
  173. da Cruz LC de TA, Serra OP, Leal-Santos FA, Ribeiro ALM, Shesharenko RD, dos Santos MA. Natural transovarial transmission of dengue virus 4 in *Aedes aegypti* from Cuiabá, State of Mato Grosso, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2015;48: 18–25. doi:10.1590/0037-8682-0264-2014
  174. Nelms BM, Fechter-Leggett E, Carroll BD, Macedo P, Klueh S, Reisen WK. Experimental and natural vertical transmission of West Nile virus by California *Culex* (Diptera: Culicidae) mosquitoes. *J Med Entomol*. 2013;50: 371–378. doi:10.1603/me12264
  175. Alencar J, de Mello CF, Marcondes CB, Guimarães AÉ, Toma HK, Bastos AQ, et al. Natural infection and vertical transmission of Zika virus in sylvatic mosquitoes *Aedes albopictus* and *Haemagogus leucocelaenus* from Rio de Janeiro, Brazil. *Trop Med Infect Dis*. 2021;6. doi:10.3390/tropicalmed6020099
  176. Lutomiah JLL, Mwandawiro C, Magambo J, Sang RC. Infection and vertical transmission of Kamiti River virus in laboratory bred *Aedes aegypti* mosquitoes. *J Insect Sci*. 2007;7: 1–7.
  177. Matthews BJ, McBride CS, DeGennaro M, Despo O, Vosshall LB. The neurotranscriptome of the *Aedes aegypti* mosquito. *BMC Genomics*. 2016;17: 32. doi:10.1186/s12864-015-2239-0
  178. Houé V, Gabiane G, Dauga C, Suez M, Madec Y, Mousson L, et al. Evolution and biological significance of flaviviral elements in the genome of the arboviral vector *Aedes albopictus*. *Emerg Microbes Infect*. 2019;8: 1265–1279. doi:10.1080/22221751.2019.1657785
  179. Tassetto M, Kunitomi M, Whitfield ZJ, Dolan PT, Sánchez-Vargas I, Garcia-Knight M, et al. Control of RNA viruses in mosquito cells through the acquisition of vDNA and endogenous viral elements. *Elife*. 2019;8: 1–29. doi:10.7554/eLife.41244
  180. Suzuki Y, Baidaliuk A, Miesen P, Frangeul L, Crist AB, Merklings SH, et al. Non-retroviral Endogenous Viral Element Limits Cognate Virus Replication in *Aedes aegypti* Ovaries. *Curr Biol*. 2020;30: 1–12. doi:10.1016/j.cub.2020.06.057
  181. Gloria-Soria A, Ayala D, Bheecarry A, Calderon-Arguedas O, Chadee DD, Chiappero M, et al. Global genetic diversity of *Aedes aegypti*. *Mol Ecol*. 2016;25: 5377–5395.

- doi:10.1111/mec.13866
182. Ciota AT, Chin PA, Ehrbar DJ, Micieli MV, Fonseca DM, Kramer LD. Differential effects of temperature and mosquito genetics determine transmissibility of arboviruses by *Aedes aegypti* in Argentina. *Am J Trop Med Hyg.* 2018;99: 417–424.  
doi:10.4269/ajtmh.18-0097
  183. Llinás GA, Gardenal CN. Phylogeography of *Aedes aegypti* in Argentina: Long-distance colonization and rapid restoration of fragmented relicts after a continental control campaign. *Vector-Borne Zoonotic Dis.* 2012;12: 254–261.  
doi:10.1089/vbz.2011.0696
  184. Díaz-Nieto LM, Chiappero MB, Díaz de Astarloa C, Maciá A, Gardenal CN, Berón CM. Genetic evidence of expansion by passive transport of *Aedes (Stegomyia) aegypti* in eastern Argentina. *PLoS Negl Trop Dis.* 2016;10: e0004839.  
doi:10.1371/journal.pntd.0004839
  185. Zanotti G, De Majo MS, Alem I, Schweigmann N, Campos RE, Fischer S. New records of *Aedes aegypti* at the southern limit of its distribution in Buenos Aires province, Argentina. *J Vector Ecol.* 2015;40: 408–411. doi:10.1111/jvec.12181
  186. Campos RE. Presencia de *Aedes (Stegomyia) Aegypti* L. (Diptera: Culicidae) en la localidad de Quilmes (Buenos Aires, Argentina). *Rev la Soc Entomológica Argentina.* 1993;52: 1993.
  187. Mullen GR, Durden LA. *Medical and Veterinary Entomology.* 3rd ed. Mullen GR, Durden LA, editors. Medical and Veterinary Entomology. Elsevier Inc.; 2018.  
doi:10.1016/B978-0-12-814043-7.00001-7
  188. Iturbe-Ormaetxe I, Walker T, O'Neill SL. Wolbachia and the biological control of mosquito-borne disease. *EMBO Rep. Nature Publishing Group;* 2011;12: 508–518.  
doi:10.1038/embor.2011.84
  189. Dutra HLC, Rocha MN, Dias FB, Mansur SB, Caragata EP, Moreira LA. Wolbachia blocks currently circulating Zika virus isolates in Brazilian *Aedes aegypti* mosquitoes. *Cell Host Microbe.* Elsevier Inc.; 2016;19: 771–774. doi:10.1016/j.chom.2016.04.021
  190. Aliota MT, Peinado SA, Velez ID, Osorio JE. The wMel strain of Wolbachia reduces transmission of Zika virus by *Aedes aegypti*. *Sci Rep. Nature Publishing Group;* 2016;6: 28792. doi:10.1038/srep28792
  191. Goic B, Stapleford KA, Frangeul L, Doucet AJ, Gausson V, Blanc H, et al. Virus-derived DNA drives mosquito vector tolerance to arboviral infection. *Nat Commun.* 2016;7: 12410. doi:10.1038/ncomms12410

192. Houé V, Bonizzoni M, Failloux AB. Endogenous non-retroviral elements in genomes of *Aedes* mosquitoes and vector competence. *Emerg Microbes Infect.* 2019;8: 542–555. doi:10.1080/22221751.2019.1599302
193. Cox BD, Stanton RA, Schinazi RF. Predicting Zika virus structural biology: Challenges and opportunities for intervention. *Antivir Chem Chemother.* 2015;24: 118–126. doi:10.1177/2040206616653873
194. Wang A, Thurmond S, Islas L, Hui K, Hai R. Zika virus genome biology and molecular pathogenesis. *Emerg Microbes Infect.* Nature Publishing Group; 2017;6: e13. doi:10.1038/emi.2016.141
195. Cortese M, Goellner S, Acosta EG, Neufeldt CJ, Oleksiuk O, Lampe M, et al. Ultrastructural characterization of Zika virus replication factories. *Cell Rep.* ElsevierCompany.; 2017;18: 2113–2123. doi:10.1016/j.celrep.2017.02.014
196. Sirohi D, Kuhn RJ. Zika virus structure, maturation, and receptors. *J Infect Dis.* 2017;216: S935–S944. doi:10.1093/infdis/jix515
197. Dick GWA, Kitchen SF, Haddock AJ. Zika virus (I). Isolations and serological specificity. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1952;46: 509–520.
198. Wikan N, Smith DR. First published report of Zika virus infection in people: Simpson, not MacNamara. *Lancet Infect Dis.* Elsevier Ltd; 2017;17: 15–17. doi:10.1016/S1473-3099(16)30525-4
199. Marchette NJ, Garcia R, Rudnick A. Isolation of Zika Virus from *Aedes Aegypti* Mosquitoes in Malaysia. *Am J Trop Med Hyg.* 1969;12: 411–15. doi:https://doi.org/10.4269/ajtmh.1969.18.411
200. Olson JG, Ksiazek TG, Suhandiman G, Triwibowo V. Zika virus, a cause of fever in Central Java, Indonesia. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1981;75: 389–393. doi:10.1016/0035-9203(81)90100-0
201. Gubler DJ, Vasilakis N, Musso D. History and Emergence of Zika Virus. *J Infect Dis.* 2017;216: S860–S867. doi:10.1093/infdis/jix451
202. Duffy MR, Chen T-H, Hancock WT, Powers AM, Kool JL, Lanciotti RS, et al. Zika Virus Outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. *N Engl J Med.* 2009;360: 2536–2543. doi:10.1056/nejmoa0805715
203. Musso D, Bossin H, Mallet HP, Besnard M, Broult J, Baudouin L, et al. Zika virus in French Polynesia 2013–14: anatomy of a completed outbreak. *Lancet Infect Dis.* 2018;18: e172–e182. doi:10.1016/S1473-3099(17)30446-2

204. Oehler E, Watrin L, Larre P, Lepercq-Goffart I, Lastère S, Valour F, et al. Zika virus infection complicated by Guillain-Barré syndrome - case report, French Polynesia, December 2013. *Eurosurveillance*. European Centre for Disease Control and Prevention (ECDC); 2014;19: 7–9. doi:10.2807/1560-7917.es2014.19.9.20720
205. Cao-Lormeau VM, Blake A, Mons S, Lastère S, Roche C, Vanhomwegen J, et al. Guillain-Barré Syndrome outbreak associated with Zika virus infection in French Polynesia: A case-control study. *Lancet*. 2016;387: 1531–1539. doi:10.1016/S0140-6736(16)00562-6
206. Tognarelli J, Ulloa S, Villagra E, Lagos J, Aguayo C, Fasce R, et al. A report on the outbreak of Zika virus on Easter Island, South Pacific, 2014. *Arch Virol*. 2015;161: 665–668. doi:10.1007/s00705-015-2695-5
207. Campos G, Bandeira A, Sardi S. Zika Virus Outbreak, Bahia, Brazil. *Emerg Infect Dis*. 2015;21: 1885–1886. doi:10.32301/eid2110.150847
208. Zanluca C, Melo VC, Mosimann AL, Dos Santos GI, Dos Santos CND, Luz K. First report of autochthonous transmission of Zika virus in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2015;110: 569–572. doi:10.1590/0074-02760150192
209. Weaver SC, Costa F, Garcia-blanco MA, Ko AI, Ribeiro GS, Saade G, et al. Zika virus: history, emergence, biology, and prospects for control. *Antivir Res*. 2016;130: 69–80. doi:10.1016/j.antiviral.2016.03.010.Zika
210. De Carvalho NS, De Carvalho BF, Fugaça CA, Dóris B, Biscaia ES. Zika virus infection during pregnancy and microcephaly occurrence: a review of literature and Brazilian data. *Brazilian J Infect Dis*. 2016;20: 282–289. doi:10.1016/j.bjid.2016.02.006
211. Johansson MA, Mier-y-Teran-Romero L, Reefhuis J, Gilboa SM, Hills SL. Zika and the risk of microcephaly. *N Engl J Med*. 2016;375: 1–4. doi:10.1056/NEJMp1605367
212. Lourenço J, Monteiro de L, Valdez T, Monteiro Rodrigues J, Pybus O, Rodrigues Faria N. Epidemiology of the Zika Virus Outbreak in the Cabo Verde Islands, West Africa. *PLoS Curr*. 2018; doi:10.1371/currents.outbreaks.19433b1e4d007451c691f138e1e67e8c
213. Beaver JT, Lelutiu N, Habib R, Skountzou I. Evolution of two major Zika virus lineages: Implications for pathology, immune response, and vaccine development. *Front Immunol*. 2018;9: 1640. doi:10.3389/fimmu.2018.01640
214. Faria NR, Quick J, Claro IM, Thézé J, De Jesus JG, Giovanetti M, et al. Establishment and cryptic transmission of Zika virus in Brazil and the Americas. *Nature*. 2017;546: 406–410. doi:10.1038/nature22401

215. Foy BD, Kobylinski KC, Foy JLC, Blitvich BJ, Travassos da Rosa A, Haddow AD, et al. Probable non-vector-borne transmission of Zika virus, Colorado, USA. *Emerg Infect Dis.* 2011;17: 880–882. doi:10.3201/eid1705.101939
216. Hills SL, Russell K, Hennessey M, Williams C, Oster AM, Fischer M, et al. Transmission of Zika virus through sexual contact with travelers to areas of ongoing transmission — Continental United States, 2016. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2016;65: 215–216. doi:10.15585/mmwr.mm6508e2
217. Musso D, Roche C, Robin E, Nhan T, Teissier A, Cao-Lormeau V-M. Potential sexual transmission of Zika virus. *Emerg Infect Dis.* 2015;21: 359–361. doi:10.3201/eid2102.141363
218. Atkinson B, Hearn P, Afrough B, Lumley S, Carter D, Aarons EJ, et al. Detection of Zika Virus in semen. *Emerg Infect Dis.* 2016;22: 940.
219. Musso D, Nhan T, Robin E, Roche C, Bierlaire D, Zisou K, et al. Potential for Zika virus transmission through blood transfusion demonstrated during an outbreak in French Polynesia, November 2013 to February 2014. *Eurosurveillance. European Centre for Disease Control and Prevention (ECDC);* 2014;19: 20761. doi:10.2807/1560-7917.ES2014.19.14.20761
220. de Araujo TVB, Rodrigues LC, de Alencar Ximenes RA, de Barros Miranda-Filho D, Montarroyos UR, de Melo APL, et al. Association between Zika virus infection and microcephaly in Brazil, January to May, 2016: preliminary report of a case-control study. *Lancet Infect Dis.* 2016;16: 1356–1363. doi:10.1016/S1473-3099(16)30318-8
221. van der Eijk AA, van Genderen PJ, Verdijk RM, Reusken CB, Mögling R, van Kampen JJ, et al. Miscarriage associated with Zika virus infection. *N Engl J Med.* 2016;375: 10. doi:10.1056/nejmc1608225
222. Mlakar J, Korva M, Tul N, Popović M, Poljšak-Prijatelj M, Mraz J, et al. Zika Virus Associated with Microcephaly. *N Engl J Med.* 2016;374: 951–958. doi:10.1056/nejmoa1600651
223. Sharma V, Sharma M, Dhull D, Sharma Y, Kaushik S, Kaushik S. Zika virus: An emerging challenge to public health worldwide. *Can J Microbiol.* 2020;66: 87–98. doi:10.1139/cjm-2019-0331
224. Epelboin Y, Talaga S, Epelboin L, Dusfour I. Zika virus: an updated review of competent or naturally infected mosquitoes. *PLoS Negl Trop Dis.* 2017;11: e0005933. doi:10.1371/journal.pntd.0005933
225. Akoua-Koffi C, Diarrassouba S, Bénéié VB, Ngbichi JM, Bozoua T, Bosson A, et al.

- Investigation surrounding a fatal case of yellow fever in Côte d'Ivoire in 1999. *Bull Soc Pathol Exot.* 2001;94: 227–230.
226. Diallo D, Sall AA, Diagne CT, Faye O, Faye O, Ba Y, et al. Zika virus emergence in mosquitoes in Southeastern Senegal, 2011. *PLoS One.* 2014;9: e109442. doi:10.1371/journal.pone.0109442
227. Ferreira-de-brito A, Ribeiro IP, Moraes De Miranda R, Surubi Fernandes R, Silva Campos S, Antunes Barbosa da Silva K, et al. First detection of natural infection of *Aedes aegypti* with Zika virus in Brazil and throughout South America. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2016;111: 655–658. doi:10.1590/0074-02760160332
228. Guerbois M, Fernandez-Salas I, Azar SR, Danis-Lozano R, Alpuche-Aranda CM, Leal G, et al. Outbreak of Zika Virus Infection, Chiapas State, Mexico, 2015, and First Confirmed Transmission by *Aedes aegypti* Mosquitoes in the Americas. *J Infect Dis.* 2016;214: 1349–1356. doi:10.1093/infdis/jiw302
229. Costa CF da, Silva AV da, Nascimento VA do, Souza VC de, Monteiro DC da S, Terrazas WCM, et al. Evidence of vertical transmission of Zika virus in field-collected eggs of *Aedes aegypti* in the Brazilian Amazon. *PLoS Negl Trop Dis.* 2018;12: 1–12. doi:10.1371/journal.pntd.0006594
230. Cevallos V, Ponce P, Waggoner JJ, Pinsky BA, Coloma J, Quiroga C, et al. Zika and Chikungunya virus detection in naturally infected *Aedes aegypti* in Ecuador. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2018;177: 74–80. doi:10.1590/0074-02760170077.Zika
231. Kauffman EB, Kramer LD. Zika virus mosquito vectors: competence, biology, and vector control. *J Infect Dis.* 2017;216: S976–S990. doi:10.1093/infdis/jix405
232. Chouin-Carneiro T, Vega-Rua A, Vazeille M, Yebakima A, Girod R, Goindin D, et al. Differential susceptibilities of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* from the Americas to Zika virus. *PLoS Negl Trop Dis.* 2016;10: 1–11. doi:10.1371/journal.pntd.0004543
233. Ciota AT, Bialosuknia SM, Zink SD, Brecher M, Ehrbar DJ, Morrissette MN, et al. Effects of Zika virus strain and *Aedes* mosquito species on vector competence. *Emerg Infect Dis.* 2017;23: 1110–1117. doi:10.3201/eid2307.161633
234. Roundy CM, Azar SR, Rossi SL, Huang JH, Leal G, Yun R, et al. Variation in *Aedes aegypti* mosquito competence for Zika virus transmission. *Emerg Infect Dis.* 2017;23: 625–632. doi:10.3201/eid2304.161484
235. Zhou TF, Lai ZT, Liu S, Zhou JY, Liu Y, Wu Y, et al. Susceptibility and interactions between *Aedes* mosquitoes and Zika viruses. *Insect Sci.* 2020; 1–13. doi:10.1111/1744-7917.12858

236. Tellechea AL, Luppó V, Morales MA, Groisman B, Baricalla A, Fabbri C, et al. Surveillance of microcephaly and selected brain anomalies in Argentina: Relationship with Zika virus and other congenital infections. *Birth Defects Res.* 2018;110: 1016–1026. doi:10.1002/bdr2.1347
237. Dirección Nacional de Epidemiología y Análisis de la Situación de Salud. Boletín Integrado de Vigilancia N° 436 – SE 03 - 2021. 2019.
238. Dirección de Epidemiología y Análisis de la Situación de Salud. Boletín Integrado de Vigilancia N° 479 – SE 52 - 2019. C.A.B.A, Argentina; 2019.
239. Dirección de Epidemiología. Boletín Integrado de Vigilancia N° 572 – SE 42 - 2021. C.A.B.A, Argentina; 2021.
240. Luo Y-P. A novel multiple membrane blood-feeding system for investigating and maintaining *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* mosquitoes. *J Vector Ecol.* 2014;39: 271–277. doi:10.1111/jvec.12101
241. Marti GA, Balsalobre A, Susevich ML, Rabinovich JE, Echeverría MG. Detection of triatomine infection by *Triatoma* virus and horizontal transmission: Protecting insectaries and prospects for biological control. *J Invertebr Pathol.* Elsevier Inc.; 2015;124: 57–60. doi:10.1016/j.jip.2014.10.008
242. Waggoner JJ, Gresh L, Vargas MJ, Ballesteros G, Tellez Y, Soda KJ, et al. Viremia and clinical presentation in Nicaraguan patients infected with Zika virus, chikungunya virus, and dengue virus. *Clin Infect Dis.* 2016;63: 1584–1590. doi:10.1093/cid/ciw589
243. R Core Team. R: a language and environment for statistical computing [Internet]. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing; 2018. Available: <https://www.r-project.org/>
244. Ott RL, Longnecker M. An introduction to statistical methods and data analysis. 6th ed. Cengage Learning; 2010.
245. Good PI. Resampling Methods. 3rd ed. Birkhauser Basel; 2006. doi:10.1007/0-8176-4444-X
246. Wickham H, François R, Henry L, Müller K. Dplyr: A Grammar of Data Manipulation. R package version 0.7.6. 2018.
247. Pan American Health Organization (PAHO), World Health Organization (WHO). Zika suspected and confirm cases reported by countries and territories in the Americas. Cumulative cases, 2015-2017 [Internet]. Pan American Health Organization. Washington, D.C.; 2017. Available: [https://www.paho.org/hq/index.php?option=com\\_content&view=article&id=12390](https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=12390)

:zika-cumulative-cases&Itemid=42090&lang=en

248. Smartt CT, Stenn TMS, Chen TY, Teixeira MG, Queiroz EP, Souza Dos Santos L, et al. Evidence of zika virus RNA fragments in *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) field-collected eggs from Camaçari, Bahia, Brazil. *J Med Entomol.* 2017;54: 1085–1087. doi:10.1093/jme/tjx058
249. Díaz-Quinonez JA, López-Martínez I, Torres-Longoria B, Vázquez-Pichardo M, Cruz-Ramírez E, Ramírez-González JE, et al. Evidence of the presence of the Zika virus in Mexico since early 2015. *Virus Genes.* 2016;52: 855–857. doi:10.1007/s11262-016-1384-0
250. Di Luca M, Severini F, Toma L, Boccolini D, Romi R, Remoli ME, et al. Experimental studies of susceptibility of Italian *Aedes albopictus* to Zika virus. *Eurosurveillance.* 2016;21: 30223. doi:10.2807/1560-7917.ES.2016.21.18.30223
251. Rückert C, Weger-Lucarelli J, Garcia-Luna SM, Young MC, Byas AD, Murrieta RA, et al. Impact of simultaneous exposure to arboviruses on infection and transmission by *Aedes aegypti* mosquitoes. *Nat Commun.* 2017;8: 1–9. doi:10.1038/ncomms15412
252. Boyer S, Calvez E, Chouin-Carneiro T, Diallo D, Failloux AB. An overview of mosquito vectors of Zika virus. *Microbes Infect.* 2018;20: 646–660. doi:10.1016/j.micinf.2018.01.006
253. Main BJ, Nicholson J, Winokur OC, Steiner C, Riemersma KK, Stuart J, et al. Vector competence of *Aedes aegypti*, *Culex tarsalis*, and *Culex quinquefasciatus* from California for Zika virus. *PLoS Negl Trop Dis.* 2018;12: e0006524. doi:10.1371/journal.pntd.0006524
254. Richards SL, Pesko K, Alto BW, Mores CN. Reduced infection in mosquitoes exposed to blood meals containing previously frozen flaviviruses. *Virus Res.* 2007;129: 224–227. doi:10.1002/cyto.a.20594.Use
255. Micieli M V., Matachiero AC, Muttis E, Fonseca DM, Aliota MT, Kramer LD. Vector competence of Argentine mosquitoes (Diptera: Culicidae) for West Nile virus (Flaviviridae: Flavivirus). *J Med Entomol.* 2013;50: 853–862. doi:10.1603/me12226
256. Lambrechts L, Chevillon C, Albright RG, Thaisomboonsuk B, Richardson JH, Jarman RG, et al. Genetic specificity and potential for local adaptation between dengue viruses and mosquito vectors. *BMC Evol Biol.* 2009;9: 160. doi:10.1186/1471-2148-9-160
257. Diagne CT, Diallo D, Faye O, Ba Y, Faye O, Gaye A, et al. Potential of selected Senegalese *Aedes spp.* mosquitoes (Diptera: Culicidae) to transmit Zika virus. *BMC*

- Infect Dis. BMC Infectious Diseases; 2015;15: 492. doi:10.1186/s12879-015-1231-2
258. Aubry F, Dabo S, Manet C, Filipović I, Rose NH, Miot EF, et al. Enhanced Zika virus susceptibility of globally invasive *Aedes aegypti* populations. Science (80- ). 2020;370: 991–996. doi:10.1126/science.abd3663
259. Secretaria de Promoción y Programas Sanitarios - Ministerio de Salud. Boletín Integrado de Vigilancia N° 320 – SE 30 2016 [Internet]. C.A.B.A, Argentina; 2016. Available: <https://www.argentina.gob.ar/sites/default/files/boletin-integrado-de-vigilancia-n320-se30.pdf>
260. Dirección de Epidemiología. Boletín Integrado de Vigilancia N° 375 – SE 35 2017 [Internet]. C.A.B.A, Argentina; 2017. Available: [http://www.msal.gob.ar/images/stories/boletines/boletin\\_integrado\\_Vigilancia\\_375.pdf](http://www.msal.gob.ar/images/stories/boletines/boletin_integrado_Vigilancia_375.pdf)
261. Lourenço-de-oliveira R, Rua AV, Vezzani D, Willat G, Vazeille M, Mousson L, et al. *Aedes aegypti* from temperate regions of South America are highly competent to transmit dengue virus. BMC. 2013;13: 610. doi:10.1186/1471-2334-13-610
262. Fischer S, De Majo MS, Quiroga L, Paez M, Schweigmann N. Long-term spatio-temporal dynamics of the mosquito *Aedes aegypti* in temperate Argentina. Bull Entomol Res. 2017;107: 225–233. doi:10.1017/s0007485316000869
263. Black IV WC, Bennett KE, Gorrochótegui-Escalante N, Barillas-Mury C V, Fernández-Salas I, Muñoz M de L, et al. Flavivirus susceptibility in *Aedes aegypti*. Arch Med Res. 2002;33: 379–388. doi:10.1016/s0188-4409(02)00373-9
264. Rossi GC. Annotated checklist, distribution, and taxonomic bibliography of the mosquitoes (Insecta: Diptera: Culicidae) of Argentina. Check List. 2015;11: 1712. doi:10.15560/11.4.1712
265. Holland J, Domingo E. Origin and evolution of viruses. Virus Genes. Boston: Kluwer Academic Publishers; 1998. pp. 13–21. Available: <http://link.springer.com/10.1023/A:1007989407305%5Cnpapers3://publication/doi/10.1023/A:1007989407305>
266. Lamballerie X De, Leroy E, Charrel RN, Tsetsarkin K, Higgs S, Gould EA. Chikungunya virus adapts to tiger mosquito via evolutionary convergence: a sign of things to come? Virol J. 2008;5: 33. doi:10.1186/1743-422X-5-33
267. Zou G, Puig-Basagoiti F, Zhang B, Qing M, Chen L, Pankiewicz KW, et al. A single-amino acid substitution in West Nile virus 2K peptide between NS4A and NS4B confers resistance to lycorine, a flavivirus inhibitor. Virology. Elsevier Inc.; 2009;384:

- 242–252. doi:10.1016/j.virol.2008.11.003
268. McMullen AR, Albayrak H, May FJ, Davis CT, Beasley DWC, Barrett ADT. Molecular evolution of lineage 2 West Nile virus. *J Gen Virol*. 2013;94: 318–325. doi:10.1099/vir.0.046888-0
269. Kuno G. Early history of laboratory breeding of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) focusing on the origins and use of selected strains. *J Med Entomol*. 2010;47: 957–971. doi:10.1603/ME10152
270. Morlan HB, Hayes RO, Schoof HF. Methods for mass rearing of *Aedes aegypti* (L.). *Public Health Rep*. 1963;78: 711–9. Available: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1915296&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
271. Clements AN. Adult food and feeding mechanisms. *The biology of mosquitoes*. 1st ed. London: Chapman and Hall; 1992. p. 509.
272. Foster WA. Mosquito sugar feeding and reproductive energetics. *Annu Rev Entomol*. 1995;40: 443–474. doi:10.1146/annurev.ento.40.1.443
273. Kauffman E, Payne A, Franke M, Schmid M, Harris E, Kramer L. Rearing of *Culex spp.* and *Aedes spp.* mosquitoes. *Bio-Protocol*. 2017;7: 1–25. doi:10.21769/BioProtoc.2542
274. Clemons A, Mori A, Haugen M, Severson DW, Duman-Scheel M. *Aedes aegypti* culturing and egg collection. *Cold Spring Harb Protoc*. 2010; 1–5. doi:10.1101/pdb.prot5507
275. Costero A, Edman JD, Clark GG, Scott TW. Life table study of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) in Puerto Rico fed only human blood versus blood plus sugar. *J Med Entomol*. 1998;35: 809–813.
276. Crowell RL. Insectary rearing of *Anopheles quadrimaculatus*. *Am J Hyg*. 1940;32: 12–20. doi:https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aje.a118663
277. Domínguez MC. Dinámica poblacional de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) en Córdoba Capital. *Rev Soc Entomol Argent*. 2000;59: 41–50.
278. Styer LM, Minnick SL, Sun AK, Scott TW. Mortality and reproductive dynamics of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) fed human blood. *Vector-Borne Zoonotic Dis*. 2007;7: 86–98. doi:10.1089/vbz.2007.0216
279. Friend WG, Smith JJB. Rearing methods, artificial feeding, and methods for the study of feeding behaviour. 1985. pp. 1–9.

280. Kasap H, Alptekin D, Kasap M, Guzel AI, Luleyap U. Artificial bloodfeeding of *Anopheles sacharovi* on a membrane apparatus. *J Am Mosq Control Assoc.* 2003;19: 367–370. doi:10.2987/8756-971x(2006)22[54:aboaso]2.0.co;2
281. Aldana E, Otalora F, Abramson CI. A new apparatus to study behavior of triatomines under laboratory conditions. *Psychol Rep.* 2005;96: 825–832.
282. Cosgrove JB, Wood RJ, Petric D, Evans DT, Abbott RHR. A convenient mosquito membrane feeding system. *J Am Mosq Control Assoc.* 1994;10: 434–436.
283. Costa-da-Silva AL, Navarrete FR, Salvador FS, Karina-Costa M, Ioshino RS, Azevedo DS, et al. Glytube: a conical tube and Parafilm M-based method as a simplified device to artificially blood-feed the dengue vector mosquito, *Aedes aegypti*. *PLoS One.* 2013;8: e53816. doi:10.1371/journal.pone.0053816
284. Tseng M. A simple Parafilm M-based method for blood-feeding *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol.* 2003;40: 588–589.
285. Muttis E, Balsalobre A, Chuchuy A, Mangudo C, Ciota AT, Kramer LD, et al. Factors related to *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) populations and temperature determine differences on life-history traits with regional implications in disease transmission. *J Med Entomol.* 2018;55: 1105–1112. doi:10.1093/jme/tjy057
286. Conover WJ. *Practical nonparametric statistics.* 3rd ed. New York, USA: John Wiley & Sons; 1999.
287. Sowilem MM, Kamal HA, Khater EI. Life table characteristics of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) from Saudi Arabia. *Trop Biomed.* 2013;30: 301–314.
288. Maimusa HA, Ahmad AH, Kassim NFA, Rahim J. Age-stage , two-sex life table characteristics of *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti* in Penang Island, Malaysia. *J Am Mosq Control Assoc.* 2016;32: 1–11. doi:http://dx.doi.org/10.2987/moco-32-01-1-11.1
289. Gunathilaka N, Ranathunge T, Udayanga L, Abeyewickreme W. Efficacy of blood sources and artificial blood feeding methods in rearing of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) for sterile insect technique and incompatible insect technique approaches in Sri Lanka. *Biomed Res Int. Hindawi;* 2017;2017. doi:10.1155/2017/3196924