

DISTRIBUCIÓN DE LA INFECCIÓN POR *Wolbachia* sp. EN MOSQUITOS DE CEMENTERIOS DEL SUR DE CHIAPAS, MÉXICO

Arnold Ernesto Roblero-Andrade¹, Gonzalo Rosales-Ramírez¹, Jorge Aurelio Torres-Monzón²,
Teresa López-Ordóñez², Rafael Ángel Avendaño-Rabiella² y Mauricio Casas-Martínez²✉

¹Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de Chiapas, Carretera a Puerto Madero Km 1.5, C. P. 30780, Tapachula, Chiapas, México.

²Centro Regional de Investigación en Salud Pública, Instituto Nacional de Salud Pública, 4ª Avenida Norte y 19 Calle Poniente s/n, Colonia Centro, C.P. 30700, Tapachula, Chiapas.

✉ Autor de correspondencia: mcasas@insp.mx

RESUMEN. El género *Wolbachia* está integrado por bacterias intracelulares obligadas de transmisión maternal que infectan artrópodos y nematodos. Esta bacteria disminuye la propagación de algunos agentes etiológicos de enfermedades mediante diversos mecanismos que incluyen el acortamiento de la vida media de los individuos, la esterilización de la población y el bloqueo de la infección. Por lo anterior, el objetivo del presente trabajo fue determinar los niveles de infección por *Wolbachia* y su distribución en diferentes especies de mosquitos del sur de Chiapas, mediante la amplificación por PCR del gen que codifica para la proteína de superficie *wsp*. En general, la población silvestre de *Ae. albopictus* presentó una tasa de infección del 42.3%, mientras que únicamente la población de *Ae. aegypti* de Motozintla presentó niveles de infección del 45.7%. Estos primeros hallazgos en el sur de Chiapas marcan la pauta para realizar investigaciones más amplias para la búsqueda del endosimbionte en otras especies de mosquitos locales con el propósito de disponer cepas nativas y contemplar su uso como posibles agentes biológicos para el control de vectores de arbovirosis en México.

Palabras clave: *Aedes albopictus*, *Aedes aegypti*, *Wolbachia*, vectores, México.

Distribution of the infection by *Wolbachia* sp. in mosquitoes of cemeteries from southern Chiapas, Mexico

ABSTRACT. The genus *Wolbachia* is composed of obligate intracellular bacteria of maternal transmission that infect arthropods and nematodes. This bacterium decreases the spread of some etiological agents of diseases through various mechanisms that include the shortening of the life span of the individuals, the sterilization of the population and the blocking of the infection. Therefore, the objective of this study was to determine *Wolbachia* infection levels and their distribution in different mosquito species from southern Chiapas, by PCR amplification of the gene *wsp* that coding for the surface protein. In general, the wild population of *Ae. albopictus* presented an infection rate of 42.3%, while only one population of *Ae. aegypti* of Motozintla had infection levels of 45.7%. These findings in southern Chiapas will serve to conducting more extensive investigations for the search for the endosymbiont in other local mosquito species in order to provide native strains and contemplate their use as possible biological agents for the control of arboviral infectious diseases in Mexico.

Keywords: *Aedes albopictus*, *Aedes aegypti*, *Wolbachia*, vectors, Mexico.

INTRODUCCIÓN

A nivel mundial las enfermedades transmitidas por vectores representan el 17% de las enfermedades en el mundo (WHO, 2017). Estas enfermedades a su vez generan un gran problema de salud pública nacional e internacional repercutiendo en cuantiosos costos y afectando la morbilidad y mortalidad de la población humana (Carneiro *et al.*, 2015). En este contexto, *Aedes aegypti* es un mosquito originario de África que tiene la capacidad de adaptarse a diversos ambientes ecológicos modificados, misma que le ha permitido ampliar su distribución geográfica a través del mundo (Cook, 2009). La variabilidad climática ha influenciado, en gran parte, la dinámica poblacional de esta especie (Barrera *et al.*, 2011), además, ha afectado la capacidad

vectorial de los mosquitos (Watts *et al.*, 1986). Entre de los principales arbovirus que transmiten los mosquitos del género *Aedes* destacan el dengue, la fiebre amarilla, chikungunya y Zika (Cook, 2009), todas ellas clasificadas como enfermedades emergentes de alta importancia a nivel global (Ocampo *et al.*, 2011). Estas enfermedades se presentan con mayor intensidad y frecuencia en las regiones con climas tropicales y subtropicales de todo el planeta (Cook, 2009).

En la actualidad se utilizan dos métodos principales para el control de las poblaciones de *Ae. aegypti* y *Ae. albopictus*, uno es el uso de insecticidas químicos y el otro es la eliminación de criaderos (Ranson *et al.*, 2010). Desafortunadamente, las poblaciones de mosquitos *Aedes* han desarrollado mecanismos de resistencia fisiológica a los insecticidas químicos y campañas para la eliminación de criaderos son muy costosas y requieren de una capacitación permanente del personal operativo (Werren *et al.*, 2008). Por esta razón, el endosimbionte del género *Wolbachia* se ha perfilado como un importante agente biológico para el control de las arbovirus transmitidas por mosquitos debido a que bloquea la infección por agentes etiológicos, disminuye la sobrevivencia del mosquito o esteriliza a la población de vectores (Ocampo *et al.*, 2011; Uyar, 2013; Caragata *et al.*, 2016).

El género *Wolbachia* está integrado por bacterias intracelulares obligadas de transmisión maternal que infectan artrópodos y nematodos (Nugapola *et al.*, 2017).

Diversos estudios han reportado que *Ae. albopictus* se encuentra frecuentemente infectado con *Wolbachia* de manera natural (Gratz, 2004; Dutton y Sinkins, 2004), mientras que en *Ae. aegypti* la infección por la bacteria es rara (Kullkarni *et al.*, 2018). Al respecto, se han realizado experimentos con los embriones de los huevos de *Ae. aegypti* en donde estos pueden ser infectados por *Wolbachia* mediante micro inyecciones de por lo menos dos cepas del endosimbionte, wMel y wMelpop cada una con diferentes mecanismos de acción pero con la capacidad de brindarle protección ante el virus dengue (Segoli *et al.*, 2014).

Por lo anterior, el objetivo del presente trabajo fue determinar los niveles de infección por *Wolbachia* y su distribución en diferentes especies de mosquitos del sur de Chiapas, mediante la amplificación por PCR del gen que codifica para la proteína de superficie *wsp*.

MATERIALES Y MÉTODO

Los mosquitos fueron colectados en 12 cementerios localizados en el sur del estado de Chiapas (Figura 1), durante tres periodos de muestreo: 1) agosto-septiembre (temporada de lluvia); 2) enero-junio 2018 (temporada de seca), y; 3) octubre 2018-febrero 2019 (temporada de transición estacional).

En cada uno de los cementerios seleccionados, un grupo de 5 personas llevaron a cabo colectas entomológicas con redes aéreas a lo largo de 2 h. Todos los mosquitos colectados fueron transportados al Laboratorio de Taxonomía y Biogeografía de Vectores del Centro Regional de Investigación en Salud Pública (CRISP) en Tapachula, para la separación por especie y sexo.

La extracción del ADN de mosquitos se realizó individualmente utilizando el kit DNAzol[®] (Invitrogen, San Diego, CA, USA) con modificaciones al protocolo del fabricante. Para analizar la presencia de *Wolbachia* se llevó a cabo la prueba de reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés), para amplificar el gen que codifica para la proteína de superficie (*wsp*). Inicialmente, se conformaron grupos de ADN de 5 individuos para ser analizados y, aquellos grupos que resultaron positivos fueron analizados de forma individual. Para la PCR se utilizó un par de iniciadores específicos en sentido: 5' TGG TCC AAT AAG TGA TGA AGA AAC 3' y antisentido: 5' AAA AAT TAA ACG CTA CTC CA 3' (Nugapola *et al.*, 2017).

La mezcla de reacción fue preparada con 1 μL de DNA, 5 μL de buffer 10X, 1 μL de MgCl_2 , 0.5 μL de dNTP's, 0.2 μL de Taq DNA polimerasa, 1 μL de cada iniciador y agua estéril hasta completar 25 μL .

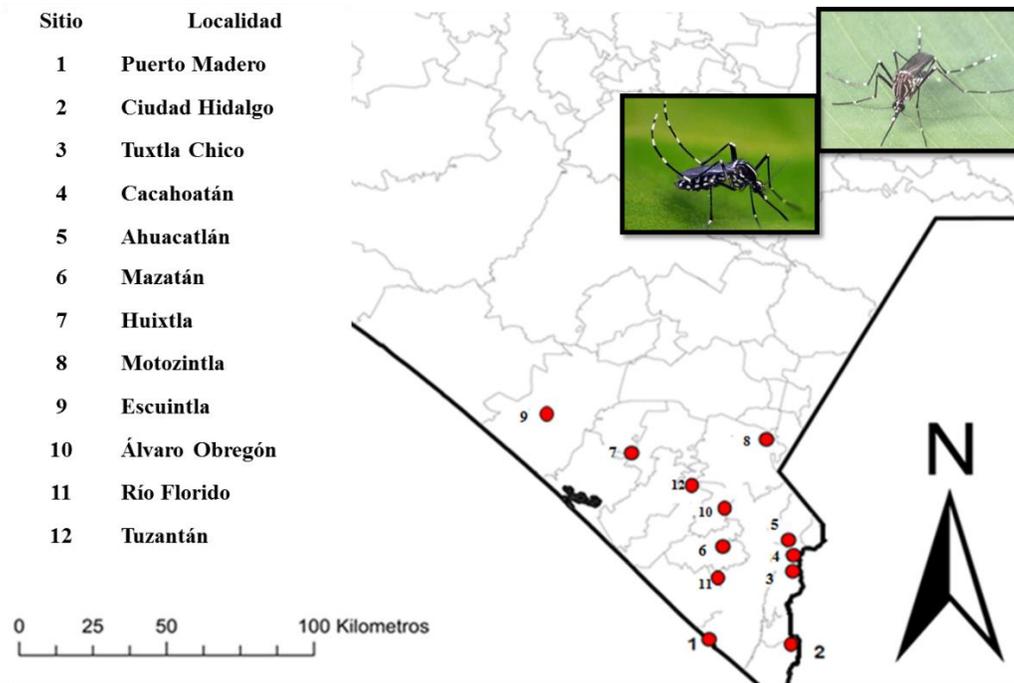


Figura 1. Localización de los sitios de colecta de mosquitos en el sur de Chiapas, México.

Las condiciones de amplificación consistieron de 94°C por 4 min, 30 ciclos de 94°C por 1 min, 55°C por 1 min y 72°C por 1 min, continuando con una extensión final de 72°C por 10 min. Finalmente, las muestras se mantuvieron a 4°C. Los productos de amplificación se observaron por electroforesis en gel de agarosa al 2% (Figura 2).

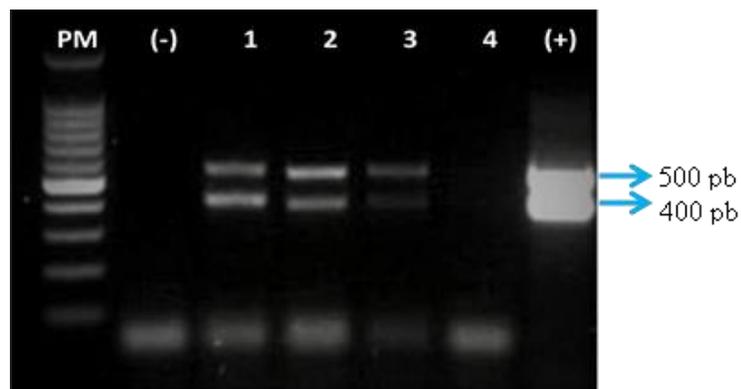


Figura 2. Productos amplificados correspondientes a los grupos A y B para *Wolbachia* detectados en mosquitos *Aedes aegypti* del cementerio de Motozintla. Se observa la banda del grupo B de 500 pb y la del grupo A de 400 pb. PM: Marcador de peso molecular (100 bp), (-) control negativo, carril 1-2 muestras de ADN de hembras de *Ae. aegypti*, carril 3-4 muestras de DNA de machos de *Ae. aegypti*, (+) control positivo.

El análisis estadístico de los datos consistió en tablas de X^2 en donde la variable dependiente fue la presencia/ausencia de *Wolbachia*, mientras que las variables independientes fueron la especie y el sexo de los mosquitos, para determinar independencia entre las variables incluidas en el análisis. Se consideraron como diferencias estadísticamente significativas los resultados con valores de $P < 0.05$.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se analizaron molecularmente un total de 379 mosquitos de los cuales 343 fueron *Ae. albopictus* (90.8%) y 35 *Ae. albopictus* (9.2%). El cuadro 1 muestra el número de mosquitos colectados en cada cementerio por especie y sexo.

Cuadro 1. Mosquitos analizados por especie y sexo para la detección de *Wolbachia* (Wb).

Localidad	Especie	Sexo	Individuos	Sin Wb	Con Wb	% infección
Ahuacatlán	<i>Ae. albopictus</i>	Hembra	3	0	3	100.0
Álvaro Obregón	<i>Ae. albopictus</i>	Hembra	5	4	1	20.0
Cacahoatán	<i>Ae. albopictus</i>	Hembra	18	4	14	77.8
Ciudad Hidalgo	<i>Ae. albopictus</i>	Hembra	20	0	20	100.0
Escuintla	<i>Ae. albopictus</i>	Hembra	1	0	1	100.0
Huixtla	<i>Ae. albopictus</i>	Hembra	84	29	55	65.5
Mazatan	<i>Ae. albopictus</i>	Hembra	4	2	2	50.0
Motozintla	<i>Ae. albopictus</i>	Hembra	147	119	27	18.4
Motozintla	<i>Ae. albopictus</i>	Macho	28	23	5	17.8
Puerto Madero	<i>Ae. albopictus</i>	Hembra	1	1	0	0.0
Río Florido	<i>Ae. albopictus</i>	Hembra	15	4	11	73.3
Tuxtla Chico	<i>Ae. albopictus</i>	Hembra	13	12	1	7.7
Tuzantán	<i>Ae. albopictus</i>	Hembra	5	0	5	100
TOTAL			344	199	145	42.2
Motozintla	<i>Ae. aegypti</i>	Hembra	13	4	9	69.2
Motozintla	<i>Ae. aegypti</i>	Macho	22	15	7	31.8
TOTAL			35	19	16	45.7

La tasa de infección natural por *Wolbachia* en las hembras de *Ae. albopictus* varió marcadamente de 7.7% en Tuxtla Chico al 100% en Ciudad Hidalgo (Tabla 1). Para el caso de Ahuacatlán, Álvaro Obregón, Escuintla, Mazatán, Puerto Madero y Tuzantán los resultados requieren de una nueva verificación debido al bajo número de individuos colectados.

La variación en el porcentaje de infección por *Wolbachia* entre las poblaciones de *Ae. albopictus* dependió del número de individuos recolectados en cada cementerio. Los resultados presentados en este trabajo son comparables con los reportados por estudios previos realizados por Casas-Martínez *et al.* (2016) con *Ae. aegypti* y *Ae. albopictus* de diferentes cementerios de la región del Soconusco, Chiapas, donde las tasas de infección fueron de 12.0-80%, así como los reportados por Villafuerte-Reyes (2018) para *Ae. albopictus* en los cementerios de Tapachula y Huehuetán donde la infección con *Wolbachia* fue de 93.0% y 94.3%, respectivamente.

La prueba estadística reveló que la infección con *Wolbachia* es dependiente del sexo, es decir, en *Ae. aegypti* las hembras fueron más susceptibles que los machos ($X^2=4.609$, 1 gl, $P=0.043$), mientras que los individuos de *Ae. albopictus* indistintamente del sexo fueron significativamente menos susceptibles a la bacteria que a *Ae. aegypti* ($X^2=7.378$, 1 gl, $P=0.008$).

El hallazgo más relevante de este trabajo fue la detección de una población neotropical de *Ae. aegypti* infectada naturalmente con *Wolbachia* en el cementerio de Motozintla, Chiapas.

Previamente, solo dos poblaciones neárticas de *Ae. aegypti* habían sido reportadas con infección natural, una en Nuevo México con el 57.4% y otra en Florida con el 4.3% (Kulkarni *et al.*, 2018).

Por último, las evidencias descritas anteriormente abren una nueva ventana de posibilidades de investigación para encontrar candidatos idóneos para el establecimiento de una estrategia alternativa de control de enfermedades transmitidas por vector basada en agentes biológicos microbianos (Brelsfoard y Dobson, 2009).

CONCLUSIONES

Este estudio es el primero en México y el segundo en América que reporta la infección natural por *Wolbachia*, un endosimbionte de mosquitos, en una población de *Ae. aegypti* del sur de Chiapas. Al mismo tiempo, constituye un avance importante para la caracterización de cepas nativas y su evaluación como posibles agentes de control vectorial y la transmisión de arbovirus.

AGRADECIMIENTOS

Al J de B. Miguel Muñoz Reyes y Aux. de Lab. y/o Bio. José Luis Aguilar Rodríguez, integrantes del Grupo BioDivector del CRISP, por su apoyo técnico durante las colectas entomológicas de campo.

El estudio formó parte del proyecto de investigación FOSEC-SEP Ciencia Básica 257973 “Detección de *Wolbachia sp.* en poblaciones mexicanas de mosquitos *Aedes sp.* y su efecto en la interacción con arbovirus de importancia médica” con apoyo financiero del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología.

LITERATURA CITADA

- Barrera R, Amador M and MacKay A. 2011. Population Dynamics of *Aedes aegypti* and Dengue as Influenced by Weather and Human Behavior in San Juan, Puerto Rico. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 5: e1378. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001378>
- Brelsfoard C.L., Dobson S.L. 2009. *Wolbachia*-based strategies to control insect pests and disease vectors. *Asian Pacific Journal of Molecular Biology and Biotechnology* 17(3): 55-63.
- Caragata EP, Dutra HL, Moreira LA. 2016. Inhibition of Zika virus by *Wolbachia* in *Aedes aegypti*. *Microbcell*. 3(7):293-5. doi: 10.15698/mic2016.07.513.
- Carneiro HL, Barbosa LM, Pearce E, Lopes JB, Maciel DA, De-Freitas RM, et al. 2015. From Lab to Field: The Influence of Urban Landscapes on the Invasive Potential of *Wolbachia* in Brazilian *Aedes aegypti* Mosquitoes. *PLoS Neglected Tropical Diseases*.; 9:e0003689. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003689>
- Casas-Martínez, M., Morán-Aceves, B., Fernández-Salas I., Torres-Monzón J.A. 2016 Infección y transmisión vertical de *Wolbachia* nativa en poblaciones de *Aedes albopictus* de cementerios urbanos del sur de México. 21° Encuentro de Investigadores. Presentación de Resúmenes. *Instituto Nacional de Salud Pública* pp21.
- Cook G, Zumla A. 2009. *Manson's Tropical Diseases*. 22ava Edición. Saunders. Londres, Inglaterra. 1830 pp.
- Dutton, T.J. y S.P. Sinkins. 2004. Strain-specific quantification of *Wolbachia* density in *Aedes albopictus* and effects of larval rearing conditions. *Insect Molecular Biology*, 13(3): 317-322. Doi: 10.1111/j.0962-1075.2004.00490.x
- Gratz, N. G. 2004. Critical review of the vector status of *Aedes albopictus*. *Medical Veterinary Entomology* 18: 215-227. Doi: 10.1111/j.0269-283X.2004.00513.x
- Kullikarni A, Yu W, Jiang J, Sanchez C, Karna A, Martinez JLK, Hanley KA, Buenemann M, Hensen IA, Xue R, Etestad P, Melman S, Duguma D, Debboun M, Xu J. 2018. *Wolbachia*

- pipientis* occurs in *Aedes aegypti* populations in New Mexico and Florida USA. (In revision).
- Ranson H, Burhani J, Lumjuan N and Black IV W. 2010. Insecticide resistance in dengue vectors. *TropI- KA* 1(1):1-12.
- Nugapola, N. N. P., De Silva, W. P. P., y Karunaratne, S. P. 2017. Distribution and phylogeny of *Wolbachia* strains in wild mosquito populations in Sri Lanka. *Parasites & Vectors*, 10(1): 230. <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2174-9>
- Ocampo CB, Salazar-Terreros MJ, Mina NJ, McAllister J and Brogdon W. 2011. Insecticide resistance status of *Aedes aegypti* in 10 localities in Colombia. *Acta Tropica* 118(1): 37-44. doi: 10.1016/j.actatropica.2011.01.007
- Ranson H, Burhani J, Lumjuan N and Black IV W. 2010. Insecticide resistance in dengue vectors. *TropIKA* 1(1):1-12.
- Segoli M, Hoffmann AA, Lloyd J, Omodei GJ, Ritchie SA. 2014. The Effect of virus blocking *Wolbachia* on male competitiveness of the dengue vector mosquito, *Aedes aegypti*. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 8: e3294. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003294>
- Villafuerte-Reyes J.D. 2018. Efecto de la infección por *Wolbachia* en la capacidad reproductiva y transmisión vertical en mosquitos *Aedes albopictus* del sur de Chiapas. Tesis de maestría. *Instituto Nacional de Salud Pública* 16 pp.
- Uyar Y. 2013. Arboviral infections around the world. *Journal of Tropical Diseases & Public Health* 1: e105. doi:10.4172/2329-891X.1000e105
- Watts DM, Burke, D, Harrison, BA, Whitmire RE, Nisalak A. 1986. Effect of temperature on the vector efficiency of *Aedes aegypti* for dengue 2 virus. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 36: 143–152. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1987.36.143>
- Werren JH, Baldo L, Clark ME. 2008. *Wolbachia*: master manipulators of invertebrate biology. *Nature reviews. Microbiology*. 6:741-51. doi: 10.1038/nrmicro1969.
- World Health Organization (WHO). 2017. Vector Borne Diseases. Geneva, Switzerland. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/vector-borne-diseases>, fecha de consulta 27-II-2019.