

Los autores declaran que no existe ningún conflicto de intereses

CORRESPONDENCIA

Rubén Bueno Marí

Parque Tecnológico de Paterna.

Ronda Auguste y Louis Lumiere, 23, nave 10.

CP 46980. Paterna (València), España.

rbeno@lokimica.es / ruben.bueno@uv.es

Rosario Gil

I2SysBio. Parque Científico de la

Universidad de València.

C/ Agustín Escardino, 9.

CP 46980. Paterna (València), España.

Rosario.gil@uv.es

CITA SUGERIDA

Bueno-Marí R, Domínguez-Santos R, Trelis M, Garrote-Sánchez E, Cholvi M, Quero de Lera F, Khoubbane M, Marcilla A, Gil R. Infecciones por *Wolbachia pipientis* en poblaciones de *Aedes albopictus* en la ciudad de València (España): implicaciones para el control de mosquitos. Rev Esp Salud Pública. 2023; 97: 2 de marzo e202303017es.

Rev Esp Salud Pública. 2023; 97: 2 de marzo e202303017es.

Infecciones por *Wolbachia pipientis* en poblaciones de *Aedes albopictus* en la ciudad de València (España): implicaciones para el control de mosquitos

AUTORES

Rubén Bueno-Marí	(1,2)	[ORCID: 0000-0002-4898-8519]
Rebeca Domínguez-Santos	(3)	[ORCID: 0000-0001-5158-6695]
María Trelis	(2,4)	[ORCID: 0000-0002-5977-3337]
Emilio Garrote-Sánchez	(3)	[ORCID: 0000-0003-2345-3179]
María Cholvi	(2)	[ORCID: 0009-0009-1275-3951]
Fermin Quero de Lera	(5)	
Messaoud Khoubbane	(2)	[ORCID: 0000-0003-4803-7198]
Antonio Marcilla	(2,4)	[ORCID: 0000-0003-0004-0531]
Rosario Gil	(3,6)	[ORCID: 0000-0002-9397-1003]

FILIACIONES

- (1)** Departamento de Investigación y Desarrollo (I+D), Laboratorios Lokímica. Paterna (València), España.
- (2)** Área de Parasitología, Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica y Parasitología, *Universitat de València*. Burjassot (València), España.
- (3)** Instituto de Biología Integrativa de Sistemas (I2SysBio), *Universitat de València*/CSIC. Paterna (València), España.
- (4)** Unidad Mixta de Endocrinología, Nutrición y Dietética Clínica, Instituto de Investigación Sanitaria La Fe. València, España.
- (5)** Servicio de Sanidad y Consumo, Ayuntamiento de València. València, España.
- (6)** Área de Genómica y Salud, Fundación para el Fomento de la Investigación Sanitaria y Biomédica de la Com. Valenciana (FISABIO). València, España.

RESUMEN

FUNDAMENTOS // La presencia de *Aedes albopictus*, de alto impacto sanitario y social, se informó por primera vez en Valencia en 2015. Las herramientas innovadoras para su control incluyen el uso de la bacteria endosimbiótica *Wolbachia pipientis*. La liberación de mosquitos machos infectados con la cepa wPip ha demostrado ser muy prometedora para aplicar la Técnica de Insectos Incompatibles (IIT) a gran escala. Antes de que esta estrategia pueda implementarse, es importante saber si las poblaciones locales de mosquitos silvestres están infectadas por *Wolbachia* y, de ser así, identificar las cepas/supergrupos infectantes, siendo estos los objetivos del presente trabajo.

MÉTODOS // Se recolectaron huevos de los diecinueve distritos de València entre mayo y octubre de 2019, y se mantuvieron en el laboratorio hasta llegar a adultos. Un total de cincuenta individuos adultos de *Ae. albopictus* fueron procesados y analizados para detectar la presencia de *Wolbachia* y su caracterización molecular. Estas acciones se enmarcaron en la colaboración establecida con la Concejalía de Salud y Consumo del Ayuntamiento de València. La prueba exacta de Fisher fue utilizada para detectar la significación estadística de las diferencias entre grupos.

RESULTADOS // El 94% de las muestras analizadas estaban infectadas de forma natural con *Wolbachia*. Se identificaron los supergrupos wAlbA y wAlbB, y la mayoría de las muestras (72% de las infectadas) presentaban coinfecciones.

CONCLUSIONES // Los datos proporcionan la primera caracterización de la presencia de *Wolbachia* en poblaciones naturales de *Ae. albopictus* en el área mediterránea de España. Esta información es relevante para evaluar el potencial uso de cepas de *Wolbachia* de cara a la supresión de poblaciones de mosquito tigre asiático mediante la liberación masiva de machos infectados artificialmente.

PALABRAS CLAVE // *Aedes albopictus*; *Wolbachia*; València; Técnica de Insectos Incompatibles (IIT); Control biológico; Control de mosquitos; Gen de rRNA 16S; wsp.

ABSTRACT

BACKGROUND // The presence of *Aedes albopictus*, of high sanitary and social impact, was first reported in Valencia (Eastern Spain) in 2015. Innovative tools for its control include the use of the endosymbiotic bacterium *Wolbachia pipientis*. The release of mosquito males infected with the wPip strain, has proven very promising for large-scale Incompatible Insect Technique (IIT) applications. Before this strategy can be implemented in Valencia, it is important to know whether the natural local mosquito populations are *Wolbachia*-infected and, if so, identifying the infecting strains/supergroups, these being the objectives of the present work.

METHODS // Eggs were collected from the 19 districts of the València city between May and October 2019. A total of 50 lab-reared adult *Ae. albopictus* individuals were processed and analyzed for *Wolbachia* detection and molecular characterization. These actions took place within the framework of a collaboration established with the Department of Health and Consumer Affairs of the city council of Valencia. Fisher's exact test was used to detect the statistical significance of the differences between groups.

RESULTS // Our study revealed that 94% of the analyzed samples were naturally infected with *Wolbachia*. Both wAlbA and wAlbB supergroups were identified, with most samples (72% of the infected ones) carrying co-infections.

CONCLUSIONS // These data provide the first characterization of the *Wolbachia* presence in natural populations of *Ae. albopictus* in the Mediterranean area of Spain. This information is relevant to evaluate the potential use of *Wolbachia* strains in order to achieve the suppression of the Asian tiger mosquito populations through massive release of artificially-infected males.

KEYWORDS // *Aedes albopictus*; *Wolbachia*; València; Insect Incompatible Technique (IIT); Biological Control; Mosquito control; 16S rRNA gene; wsp.

INTRODUCCIÓN

LA INVASIÓN DE *Aedes albopictus* (Skuse, 1894), conocido como mosquito tigre asiático, ha sido reportada en casi todo el planeta (1). Su reconocida importancia clínica radica en su potencial para transmitir diversos patógenos que causan enfermedades, como la dirofilariosis, así como arbovirosis antroponóticas, incluyendo el dengue (DENV), el chikungunya (CHIKV) o el Zika (ZIKV) (2-5). El elevado riesgo de transmisión de estas enfermedades se debe a varias razones concomitantes, incluyendo factores climáticos y socioeconómicos, el transporte y comercio internacional, y los sistemas de salud pública (6). En este contexto, países mediterráneos como Italia, Francia, Croacia y España han declarado casos autóctonos de transmisión de DENV, CHIKV y ZIKV en los últimos años (5,7-10). La situación del DENV es particularmente preocupante, dado que el dengue ha emergido recientemente como la enfermedad viral más importante transmitida por mosquitos a nivel mundial (11). En el sur de Europa se han dado varios episodios de transmisión autóctona de dengue (12), siendo España en 2015 el primer lugar de Europa en que se detectaron mosquitos *Ae. albopictus* infectados con DENV (13). Las medidas tradicionales de control para reducir las poblaciones de mosquito incluyen la reducción de criaderos disponibles, la educación pública y la aplicación rutinaria de insecticidas, implementada por cientos de municipios de toda Europa (14). Sin embargo, en algunos casos, el porcentaje de éxito se ve limitado por los bajos niveles de participación comunitaria, la falta de coordinación entre las diferentes administraciones y las prácticas deficientes en la aplicación de los insecticidas. Por otra parte, la posibilidad de desarrollo de resistencia a insecticidas supone un problema adicional que impide conseguir resultados óptimos en el control de *Ae. albopictus* en Europa (15). Por todo ello, hay un elevado grado de consenso en la comunidad científica acerca de la necesidad de buscar méto-

dos innovadores y complementarios para el control de esta especie de mosquito en ambientes urbanos.

La presencia de *Ae. albopictus* fue descrita por primera vez en España en 2004 (16). Desde entonces, se ha extendido desde Cataluña al resto del área mediterránea, incluidas las Islas Baleares (17), así como a otras regiones del interior y norte de España como Madrid, Extremadura y País Vasco (18-20). En 2015 se detectó por primera vez en la ciudad de València (21). A partir de ese momento, su control poblacional se ha convertido en un objetivo prioritario para los servicios públicos municipales de salud (22). Las principales medidas de control incluyen el tratamiento de los criaderos y zonas de refugio con insecticidas químicos, la participación comunitaria, así como otras estrategias de origen biológico. Estas últimas evitan algunos de los inconvenientes del uso de insecticidas químicos convencionales, como son su falta de especificidad contra un insecto concreto, su toxicidad para los humanos y el medio ambiente, así como la posibilidad de facilitar la aparición de resistencias (6,23).

A nivel mundial se han utilizado diferentes estrategias biológicas (24), tales como la aplicación de biolarvicidas basados mayoritariamente en formulaciones de *Bacillus thuringiensis*, la Técnica del Insecto Estéril (TIE) mediante la liberación de machos irradiados, la obtención de insectos transgénicos mediante modificación genética, o el uso de endosimbiontes como *Wolbachia* para provocar la muerte de los embriones por Incompatibilidad Citoplasmática (CI) entre los gametos parentales (conocida como Técnica del Insecto Incompatible [IIT]) (25,26). La IIT tiene la ventaja de que no implica la liberación de organismos mutantes o manipulados genéticamente. La supresión de la población de mosquitos *Aedes* mediante la implementación de una estrategia basada en *Wolbachia* se considera un método de gran impacto para el manejo de la resistencia a los insecticidas (27).

Infecciones por *Wolbachia pipiensis* en poblaciones de *Aedes albopictus* en la ciudad de València (España): implicaciones para el control de mosquitos

RUBÉN BUENO-MARI et al.

Rev Esp Salud Pública
Volumen 97
2/3/2023
202303017es

Wolbachia pipientis (Alphaproteobacteria: Rickettsiales) es un endosimbionte transmitido por vía materna que se estima que puede infectar hasta el 66% de las especies de insectos conocidas (28). Esta única especie reconocida del género *Wolbachia* se clasifica en supergrupos de la A a la U (29). Los supergrupos A y B infectan solo a artrópodos, donde actúan principalmente como parásitos reproductivos. En estos casos, distintas cepas de *Wolbachia* provocan diferentes alteraciones en sus hospedadores para aumentar su transmisión a la siguiente generación, siendo la CI la manipulación más frecuente (30). *Wolbachia* se ha utilizado para el control de plagas y vectores de enfermedades porque no solo altera la reproducción del hospedador, sino que también bloquea la replicación y transmisión del virus (31). Por esta razón, poblaciones infectadas con este endosimbionte se liberan al campo con dos posibles objetivos: reemplazamiento o supresión de poblaciones (32). El éxito de ambos enfoques se basa en la capacidad de la nueva cepa introducida de *Wolbachia* para inducir CI en la población de mosquitos nativos. Por lo tanto, la presencia natural de determinadas infecciones de *Wolbachia* en poblaciones silvestres de mosquitos podría interferir con los programas de control, haciendo que el reemplazo o la supresión de la población sea difícil o incluso resulte imposible.

La presencia de las cepas wAlbA y wAlbB de *Wolbachia*, pertenecientes a los supergrupos A y B respectivamente, ha sido ampliamente descrita en poblaciones naturales de *Ae. albopictus* (33,34), donde los individuos infectados suelen portar una o ambas cepas (35). No se han encontrado otras cepas de forma natural en esta especie de mosquito, aunque no se puede descartar, ya que se sabe que *Wolbachia* se transmite horizontalmente entre especies de insectos filogenéticamente distantes (36). Estudios pioneros realizados en Italia han descrito la generación en laboratorio de una nueva línea ARwP de *Ae. albopictus* en la que se han sustituido las cepas naturales de *Wolbachia* por la cepa wPip obtenida

de *Culex pipiens* (Linnaeus, 1758) (37); muy recientemente, el mismo grupo informó sobre el primer experimento de campo en Europa para evaluar la incapacidad de los mosquitos macho de la línea ARwP para producir descendencia viable tras su apareamiento con hembras silvestres de *Ae. albopictus* (38). Estos estudios refuerzan la IIT como enfoque adecuado para reducir y/o suprimir las poblaciones de mosquito tigre asiático en el área mediterránea.

En el presente estudio, como primer paso hacia la implementación de una estrategia IIT similar a la exitosa antes mencionada, se investigó la presencia de *Wolbachia* en poblaciones naturales de *Ae. albopictus* en la ciudad de València (España).

MATERIALES Y MÉTODOS



Muestreo de mosquitos. Los huevos se recogieron mediante el uso de trampas de oviposición estándar (9). Se utilizaron contenedores de plástico negro (volumen: 0,4 L) llenos de agua (2/3 de capacidad) y complementados con un palo de madera como soporte para la oviposición. El muestreo se llevó a cabo entre mayo y octubre de 2019, coincidiendo con el periodo de actividad más importante de la especie, en los diecinueve distritos de la ciudad de València [Figura 1; Anexo I]. El muestreo se realizó espaciotemporalmente de la siguiente manera: mayo, distritos 1, 2 y 3 del centro urbano; junio, distritos urbanos periféricos 4, 5 y 6; julio, distritos urbanos periféricos 7, 8 y 9; agosto, distritos urbanos periféricos 10, 11 y 12; septiembre, distritos urbanos periféricos 13, 14, 15 y 16; octubre, distritos rurales periféricos 17, 18 y 19. El número de huevos colectados con ovitrampas por distrito osciló entre nueve y ciento doce. Los microhábitats específicos donde se instalaron las ovitrampas se caracterizaban por ser lugares umbríos bien cubiertos por vegetación. Los huevos recolectados se criaron en condiciones de laboratorio hasta la emergencia del adulto, como se había descrito anteriormente (39).

Infecciones por *Wolbachia pipientis* en poblaciones de *Aedes albopictus* en la ciudad de València (España): implicaciones para el control de mosquitos

RUBÉN
BUENO-MARÍ
et al.

Rev Esp Salud Pública
Volumen 97
2/3/2023
e202303017es

Distribución espacial de los sitios de muestreo para la recolección de huevos de *Ae. albopictus* en los diecinueve distritos de la ciudad de València, España (en números).



Los puntos indican los sitios de muestreo.

Insectos adultos de siete a diez días, tanto machos como hembras, se congelaron a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ para fijarlos y se preservaron en el congelador hasta la extracción del ADN total. La identificación de especie y sexo se confirmó bajo microscopio binocular según los criterios de Schaffnet *et al.* (40) La selección de individuos para los análisis de presencia de *Wolbachia* se hizo aleatoriamente, eligiendo al menos un macho y una hembra por distrito.

el ADN total (ADNt) utilizando el kit *DNeasy Blood and Tissue* (Qiagen, Hilden, Alemania), siguiendo el protocolo del fabricante y utilizando un volumen de elución final de $100\text{ }\mu\text{L}$. La calidad y cantidad de ADN se determinó con un espectrofotómetro *NanoDrop ND-1000*.

Genotipado de *Wolbachia*: Extracción de ADN total, amplificación, secuenciación y análisis filogenético. Mosquitos adultos individuales se lisaron y homogeneizaron en $200\text{ }\mu\text{L}$ de tampón fosfato salino (PBS) con la ayuda de palillos estériles. Tras centrifugar a baja velocidad (800 xg) durante veinte min, se extrajo

Todas las muestras de ADNt se analizaron para detectar la presencia de *Wolbachia* mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la amplificación de los marcadores moleculares *wsp* (cebadores: 81F, $5'\text{-TGGTCCAATAAGTGATGAAGAAAC-3'}$; 691R, $5'\text{-AAAAATTAAACGCCTCCA-3'}$) y el gen de ARNr 16S (cebadores: WolbF, $5'\text{-GAAGATAATGACGGTACTCAC-3'}$; WspecR, $5'\text{-AGCTTCGAGTCAAACCAATTC-3'}$) (41). Las muestras negativas se analizaron con cebadores para ampli-

Infecciones por *Wolbachia pipiensis* en poblaciones de *Aedes albopictus* en la ciudad de València (España): implicaciones para el control de mosquitos

RUBÉN BUENO-MARÍ *et al.*

Rev Esp Salud Pública
Volumen 97
2/3/2023
e202303017es

ficar el gen ribosomal S7 del hospedador de cara a evaluar la calidad del ADN (5'-ATGGTTTTCGGATCAAAGGT-3' y 5'-CGACCTTGTTCAATGTTG-3') (42). Las muestras positivas se analizaron con cebadores directos de *wsp* específicos para las cepas wAlbA (328F, 5'-CCAGCAGATACTATTGCG-3') y wAlbB (183F, 5'-AAGGAACCGAAGTTCATG-3'), junto al antes mencionado cebador reverso 691R (35). Brevemente, las ampliificaciones de PCR se realizaron sobre 2-5 µL de ADNt del insecto en 50 µL de reacción con 0,2 µM de cada cebador adecuado, 1x Key Buffer, 2,5 mM MgCl₂, 0,2 mM de cada dNTP, una unidad de Taq DNA Polymerase (VWR) y agua purificada para PCR hasta completar el volumen final. Se añadió DMSO 4% a la mezcla de reacción cuando la primera ampliificación fallaba. El perfil de las temperaturas utilizadas fue el siguiente: un ciclo inicial de desnaturalización durante 4 min a 95 °C, seguido de cuarenta ciclos de desnaturalización a 95 °C durante 1 min, unión a cebador a 55 °C durante 1 min, y extensión a 72 °C durante 1 min, más un ciclo de extensión final a 72 °C durante 10 min. Se hicieron dos réplicas para cada muestra y todos los experimentos de PCR incluyeron controles positivos y negativos. Como control positivo utilizamos ADNt de una línea de *Ae. albopictus* coinfectado con *Wolbachia* wAlbA y wAlbB, proporcionado por las Dras. Nuria Busquets y Sandra Talavera (Centro de Investigación en Salud Animal IRTA-CReSA, Barcelona). En el control negativo, el ADNt molde era sustituido por agua. El tamaño de los amplicones se comprobó mediante electroforesis en gel de agarosa al 2%, teñido con *SafeView™ Classic stain* (NBS Biologicals, Huntingdon, Reino Unido), y visualizado con luz UV.

La secuenciación ABI de amplicones seleccionados para confirmar su identidad se llevó a cabo en la Sección de Genómica de la *Universitat de València* (Servicio Central de Soporte a la Investigación Experimental, SCSIE). Las lecturas fueron inspeccionadas y ensambladas con el Paquete Staden ([\[sourceforge.net\]\(http://sourceforge.net\)\) \(43\) y posteriormente comparadas con secuencias de *Wolbachia* disponibles en GenBank mediante BLAST \(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>\) \(44\). Las secuencias de ADN determinadas en este estudio han sido depositadas en GenBank \(números de acceso indicados en la TABLA 1\). Utilizamos secuencias de *Wolbachia* seleccionadas obtenidas de GenBank \[TABLA 1\] para realizar los alineamientos con MEGA \(45\). El análisis filogenético se realizó por máxima verosimilitud con el modelo GTR+G+I. El análisis Bootstrap se realizó con 1.000 repeticiones. Utilizamos el software Fig-Tree v1.4.0 \(<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>\) para visualizar y editar los árboles filogenéticos obtenidos.](http://staden.</p></div><div data-bbox=)

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

NUESTROS DATOS REVELARON QUE EL 94% de las muestras analizadas portaban *Wolbachia* de manera natural, de las cuales el 72,3% estaban superinfectadas con las cepas wAlbA y wAlbB [TABLA 2 Y ANEXO I]. Se investigó la presencia de *Wolbachia* mediante PCR en un total de cincuenta insectos adultos (veinticinco hembras y veinticinco machos) utilizando cebadores *wsp* genéricos. De estas, cuarenta y siete muestras (veinticuatro hembras y veintitrés machos) dieron resultados positivos, revelando una tasa de infección muy alta. La posibilidad de resultados negativos debido a un problema de ampliificación causado por una baja calidad del ADNt purificado se descartó, ya que las tres muestras negativas fueron positivas para el gen ribosomal S7 del hospedador. Dado que la coinfección con las cepas wAlbA y wAlbB se ha encontrado con frecuencia en todo el mundo (33), las muestras positivas se analizaron posteriormente con cebadores específicos para cada cepa en reacciones separadas (35). Todas las muestras ampliificadas y secuenciadas demostraron ser idénticas a las secuencias *wsp* de wAlbA y wAlbB encontradas en GenBank, y se agruparon con las secuencias correspondientes en un análisis filogenético [FIGURA 2].



Secuencias parciales de *wsp* de *Wolbachia* incluidas en el análisis filoe genético.

Número de acceso	Insecto hospedador	Referencia
AF020058	<i>Aedes albopictus</i>	33
AF020059	<i>Aedes albopictus</i>	33
AY462863	<i>Aedes albopictus</i>	44
HM007832	<i>Aedes albopictus</i>	45
JX129187	<i>Aedes albopictus</i>	45
OP066400	<i>Aedes albopictus</i>	Este estudio
OP066401	<i>Aedes albopictus</i>	Este estudio
AF020061	<i>Culex pipiens</i>	33
AY462861	<i>Culex quinquefasciatus</i>	44
AF020072	<i>Drosophila melanogaster</i>	33
AF020068	<i>Drosophila simulans</i>	46
AF020070	<i>Drosophila simulans</i>	46
AB039284	<i>Dryinid wasp</i>	47
AF020076	<i>Ephestia cautella</i>	33
AF020077	<i>Glossina austeni</i>	33
AF020079	<i>Glossina morsitans</i>	33
AF020080	<i>Laodelphax striatellus</i>	33
AF020071	<i>Muscidifurx uniraptor</i>	33
AF481181	<i>Nilaparvata lugens</i>	48
AF020082	<i>Phlebotomus papatasi</i>	33
AF020083	<i>Tribolium confusum</i>	33
AF020084	<i>Trichogramma deion</i>	33

Tabla 2

Estado de infección de los mosquitos *Aedes albopictus* adultos individuales analizados en este estudio.

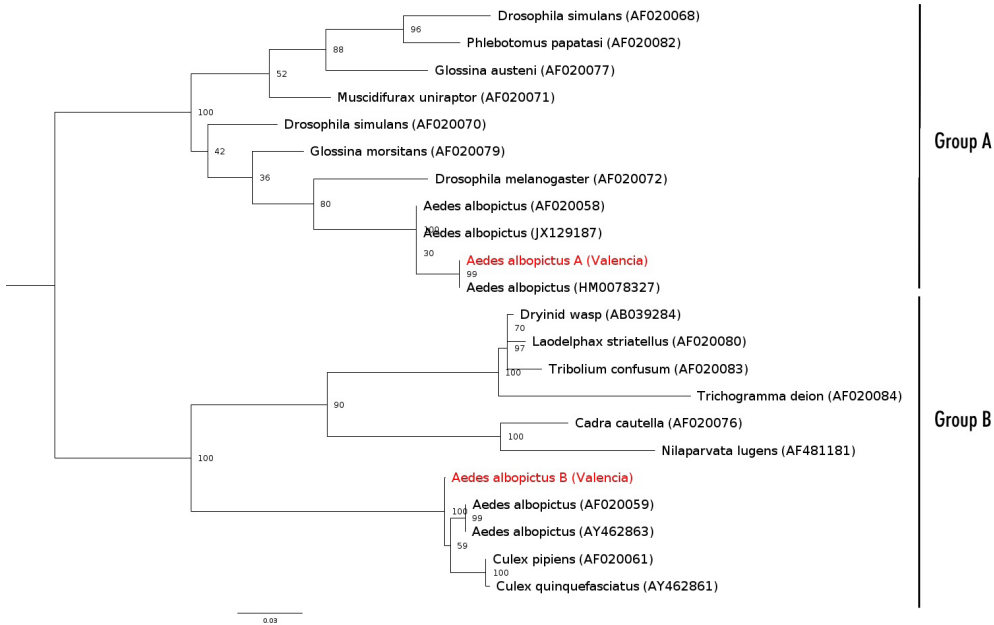
Sexo	A+B+	A+B-	A-B+	A-B-
Hembras	21	3	0	1
Machos	13	1	9	2

Infecciones por *Wolbachia pipientis* en poblaciones de *Aedes albopictus* en la ciudad de València (España): implicaciones para el control de mosquitos

RUBÉN BUENO-MARÍ et al.

Figura 2

Análisis filogenético de las secuencias nucleotídicas parciales de *wsp* de *Wolbachia* obtenidas a partir de *Ae. albopictus* recolectado en Valencia, España (en rojo).



La barra de escala representa sustituciones por sitio.

Los resultados obtenidos en nuestro estudio confirmaron la posibilidad de implementar el IIT basado en la liberación machos de *Ae. albopictus* infectados con *wPip* en la ciudad de València en un futuro próximo, ya que las poblaciones salvajes de mosquito tigre asiático no estaban infectadas de forma natural por esta cepa endosimbionte. Nuestros próximos pasos se centrarán en la selección de subcepas de *wPip* apropiadas que infecten de forma natural a las poblaciones de *Cx. pipiens* autóctonas y transferirlas por microinyección a *Ae. albopictus*, con el fin de obtener y mantener en cautividad una colonia artificial cuyos machos puedan ser liberados en el ambiente urbano y causar CI tras su apareamiento con hembras silvestres.

Estudios recientes en Italia respaldan la liberación de machos de una línea de *Ae. albopictus* infectada con *Wolbachia wPip* (ARwP) para llevar a cabo estrategias de supresión autocida contra el mosquito tigre asiático (51,52), siendo conveniente antes de iniciar la IIT proceder con una detección e identificación de las cepas de *Wolbachia* presentes en las poblaciones locales de *Ae. albopictus* para prevenir efectos inesperados, como una ineficiente pérdida de compatibilidad (53).

Esta alta tasa de infección por *Wolbachia* en una población silvestre de *Ae. albopictus* (94%) detectada en nuestro estudio es similar a la prevalencia encontrada en países asiáticos como China (93,3 y 95,52%) (54,55), Tailan-

Infecciones por *Wolbachia pipiens* en poblaciones de *Aedes albopictus* en la ciudad de València (España): implicaciones para el control de mosquitos

RUBÉN BUENO-MARÍ et al.

Rev Esp Salud Pública Volumen 97 2/3/2023 e202303017es

◀
 dia (100%) (56) o Corea del Sur (99%) (57), así como en los Estados Unidos (95%) (58) y Brasil (99,3%) (59), y lejos de la baja prevalencia encontrada en México (38%) (60). Se han publicado muy pocos informes en los países mediterráneos, con grandes diferencias encontradas en diferentes lugares de Francia (metropolitana y Córcega) (53,61) y Grecia (53).

En nuestro estudio, el estado infeccioso de machos y hembras difirió significativamente (p-valor: 0,0067, utilizando la prueba exacta de Fisher). La mayoría de las hembras de mosquito infectadas portaban superinfecciones (84%); en el caso de los machos, el 54% de ellos eran portadores también de ambas cepas de *Wolbachia*, pero el 36% de ellos presentaron infección única con wAlbB. Estos resultados están de acuerdo con lo que se había encontrado previamente, con superinfecciones prácticamente fijadas entre las hembras (33,35,56) y pérdida de wAlbA con la edad en los machos (53).

Un trabajo reciente que utilizó machos de la línea ARwP liberados en áreas urbanas de Roma (Italia) confirmó la viabilidad de la IIT como una forma de controlar poblaciones de *Ae. albopictus* (38). Los autores obtuvieron resultados prometedores, ya que el 30% de las hembras recolectadas en los puntos de liberación eran estériles, y el 20% tenía una fertilidad muy reducida en comparación con los controles. Además, la longevidad de estos machos no se vio afectada por la infección de wPip, ya que sobrevivieron hasta dos semanas después de la liberación, lo que se considera adecuado para la preservación de la aptitud reproductiva en los machos, y muy similar a los machos de mosquitos tigre asiáticos silvestres en condiciones normales (62). Estos resultados van en la misma línea que los encontrados en un estudio anterior realizado por el mismo grupo en condiciones de laboratorio (63), donde no se encontraron diferencias estadísticamente significativas con respecto a longevidad, tasa de apareamiento, capacidad espermiática y compe-


titividad de apareamiento entre machos de *Ae. albopictus* mantenidos en condiciones de laboratorio o en invernaderos.

Finalmente, es importante abordar el estado actual de la regulación del uso de enfoques de control basados en *Wolbachia* en Europa. Cualquier producto que se vaya a utilizar para controlar organismos no deseados (mosquitos incluidos) que sean nocivos para la salud humana o animal, o para el medio ambiente, o que simplemente puedan causar daños a las actividades humanas, debe ser registrado en Europa como biocida según el *Reglamento de Productos Biocidas 528/2012* de la UE (64). Después de recopilar información sobre el uso de *Wolbachia* como potencial biocida en Europa, la Comisión Europea dictaminó recientemente su uso declarando lo siguiente: *Las bacterias del género Wolbachia, o cualquier preparación que contenga esas bacterias, utilizadas con el propósito de inocular esas bacterias en mosquitos, con el objetivo de crear mosquitos no infectados de forma natural con fines de control de vectores, se considerará un biocida; mientras que los mosquitos no infectados de forma natural, independientemente de la técnica de infección utilizada, no se considerarán ni un producto biocida ni un artículo tratado* (65). Teniendo en cuenta estas regulaciones, existe una hoja de ruta para la introducción de *Wolbachia* en los programas de control de vectores en Europa de acuerdo con las leyes europeas. En este contexto, el Ayuntamiento de València apoya una iniciativa pionera en España para la implantación de cepas de *Wolbachia* como sistema de control de las poblaciones de *Ae. albopictus*.

AGRADECIMIENTOS



Los autores quieren agradecer a los técnicos de Lokímica SA por su colaboración en el análisis y recogida de muestras en campo; a las Dras. Nuria Busquets y Sandra Talavera, del Centro de Investigación en Salud Animal IRTA-CReSA (Barcelona, España), por su

guía y provisión de muestras de control positivo. Este trabajo se realizó en el marco de la Acción AIM-COST CA17108 y ha sido parcialmente financiado mediante diferentes contratos específicos por parte del Servicio de Sanidad y Consumo del *Ajuntament de València*. 

REFERENCIAS



1. Kraemer MUG, Sinka ME, Duda KA, Mylne AQN, Shearer FM, Barker CM *et al.* *The global distribution of the arbovirus vectors Aedes aegypti and Ae. albopictus.* eLife. 2015 Jun 30;4:e08347. doi: <https://dx.doi.org/10.7554/eLife.08347>
2. Vazeille M, Moutailler S, Coudrier D, Rousseaux C, Khun H, Huerre M *et al.* *Two chikungunya isolates from the outbreak of La Reunion (Indian Ocean) exhibit different patterns of infection in the mosquito, Aedes albopictus.* PloS One. 2007 Nov 14;2(11):e1168. doi: <https://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0001168>
3. Zhao H, Zhang FC, Zhu Q, Wang J, Hong WX, Zhao LZ *et al.* *Epidemiological and virological characterizations of the 2014 dengue outbreak in Guangzhou, China.* PloS One; 2016 Jun 3;11(6):e0156548. doi: <https://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0156548>
4. McKenzie BA, Wilson AE, Zohdy S. *Aedes albopictus is a competent vector of Zika virus: A meta-analysis.* PloS One. 2019 May 21;14(5):e0216794. doi: <https://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0216794>
5. Barzon L, Gobbi G, Capelli G, Montarsi F, Martini S, Riccetti S *et al.* *Autochthonous dengue outbreak in Italy 2020: clinical, virological and entomological findings.* J Travel Med. 2021 Dec 29;28(8):taab130. doi: <https://dx.doi.org/10.1093/jtm/taab130>
6. Jourdain F, Roiz D, de Valk H, Noël H, Lambert G, Franke F *et al.* *From importation to autochthonous transmission: Drivers of chikungunya and dengue emergence in a temperate area.* PloS Negl Trop Dis. 2020 May 11;14(5):e0008320. doi: <https://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0008320>
7. Gjenero-Margan I, Aleraj B, Krajcar D, Lesnikar V, Klobučar A, Pem-Novosel I *et al.* *Autochthonous dengue fever in Croatia, August-September 2010.* Euro Surveill. 2011 Mar 3;16(9):19805. [consultado 10 agosto 2022]. Disponible en: <https://www.eurosurveillance.org/content/10.2807/ese.16.09.19805-en>





8. Venturi G, Di Luca M, Fortuna C, Remoli ME, Riccardi F, Severini F, Toma L *et al.* *Detection of a chikungunya outbreak in central Italy, August to September 2017.* Euro Surveill. 2017 Sep;22(39):17-00646. doi: <https://dx.doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2017.22.39.17-00646>
9. European Center for Disease Control (ECDC). *Local transmission of dengue fever in France and Spain-2018.* Rapid Risk Assessment: 13 pp. [consultado 10 agosto 2022]. Disponible en <https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/08-10-2018-RRA-Dengue-France.pdf>
10. Brady OJ, Hay SI. *The first local cases of Zika virus in Europe.* Lancet. 2019 Nov 30;394(10213):1991-1992. doi: [https://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(19\)32790-4](https://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(19)32790-4)
11. Bhatt S, Gething PW, Brady OJ, Messina JP, Farlow AW, Moyes CL *et al.* *The global distribution and burden of dengue.* Nature. 2013 Apr 25;496(7446):504-7. doi: <https://dx.doi.org/10.1038/nature12060>
12. European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). *Rapid risk assessment: Autochthonous cases of dengue in Spain and France, 1 October 2019.* [consultado 10 agosto 2022]. Disponible en: <https://www.ecdc.europa.eu/sites/portal/files/documents/RRA-dengue-in-Spain-and-France.pdf>
13. Aranda C, Martínez MJ, Montalvo T, Eritja R, Navarro-Castillejos J, Herreros E *et al.* *Arbovirus surveillance: first dengue virus detection in local Aedes albopictus mosquitoes in Europe, Catalonia, Spain, 2015.* Euro Surveill. 2018 Nov;23(47):1700837. doi: <https://dx.doi.org/10.2807/1560-7917.es.2018.23.47.1700837>
14. Baldacchino F, Caputo B, Chandre F, Drago A, della Torre A, Montarsi F *et al.* *Control methods against invasive Aedes mosquitoes in Europe: a review.* Pest Manag Sci. 2015 Nov;71(11):1471-85. doi: <https://dx.doi.org/10.1002/ps.4044>
15. Pichler V, Bellini R, Veronesi R, Arnoldi D, Rizzoli A, Lia RP *et al.* *First evidence of resistance to pyrethroid insecticides in Italian Aedes albopictus populations 26 years after invasion.* Pest Manag Sci. 2018 Jun;74(6):1319-1327. doi: <https://dx.doi.org/10.1002/ps.4840>
16. Aranda C, Eritja R, Roiz, D. *First record and establishment of the mosquito Aedes albopictus in Spain.* Med Vet Entomol. 2006 Mar;20(1):150-152. doi: <https://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2915.2006.00605.x>
17. Lucientes-Curdi J, Molina-Moreno R, Amela-Heras C, Simon-Soria F, Santos-Sanz S, Sánchez-Gómez A *et al.* *Dispersion of Aedes albopictus in the Spanish Mediterranean Area.* Eur J Public Health. 2014 Aug;24(4):637-640. doi: <https://dx.doi.org/10.1093/eurpub/cku002>
18. Ministerio de Sanidad, Consumo y Bienestar Social (MSCBS). 2019. *Vigilancia Entomológica: resultados de 2018.* [consultado 10 agosto 2022]. Disponible en: https://www.msbs.gob.es/ciudadanos/saludAmbLaboral/docs/Encuesta_Vigilancia_Entomologica.2018.pdf
19. Melero-Alcibar R, Tello A, Marino E, Vázquez, MA. *Aedes (Stegomyia) albopictus (Skuse, 1894) (Diptera, Culicidae) first detection for the Community of Madrid, Spain.* Boln. Asoc. Esp. Ent. 2017; 41 (3-4): 515-519.
20. Ordóñez Iriarte JM, Iriso Calle A, Fuster Lorán F, Tello Fierro A, Junco Bonet A, De la Cruz Pérez M. *Vigilancia entomológica de Aedes (Stegomyia) albopictus (Skuse, 1894) en la Comunidad de Madrid: avance de resultados 2016-2020.* Rev. Salud ambient. 2021; 21(2):160-169.
21. Bueno-Marí R, Quero de Lera F. *Vigilancia entomológica frente a mosquitos invasores en la ciudad de Valencia: primer registro del mosquito tigre, Aedes albopictus (Skuse, 1894), en el municipio.* Zool Baetica. 2015; 26, 145-151.
22. Bueno-Marí R, Quero de Lera F. *Gestión vectorial de los casos de arbovirosis notificados en la ciudad de Valencia, España (2016-2018).* 2021 May 10;95:e202105064.
23. Tancredi A, Papandrea D, Marconcini M, Carballar-Lejarazu R, Casas-Martinez M, Lo E *et al.* *Tracing temporal and geographic distribution of resistance to pyrethroids in the arboviral vector Aedes albopictus.* PLoS Negl Trop Dis. 2020 Jun 22;14(6):e0008350. doi: <https://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0008350>
24. Huang Y-JS, Higgs S, Vanlandingham DL. *Biological control strategies for mosquito vectors of arbo-*

ruses. *Insects*. 2017 Feb 10;8(1):21. doi: <https://dx.doi.org/10.3390/insects8010021>

25. Alphey N Bonsall, MB. *Genetics-based methods for agricultural insect pest management*. *Agric For Entomol*. 2018 May;20(2):131-140. doi: <https://dx.doi.org/10.1111/afe.12241>

26. Sicard M, Bonneau M, Weill M. *Wolbachia prevalence, diversity, and ability to induce cytoplasmic incompatibility in mosquitoes*. *Curr Opin Insect Sci*. 2019 Aug;34:12-20. doi: <https://dx.doi.org/10.1016/j.cois.2019.02.005>

27. Achee NL, Grieco JP, Vatandoost H, Seixas G, Pinto J, Ching-Ng et al. *Alternative strategies for mosquito-borne arbovirus control*. *PLoS Negl Trop Dis*. 2019 Jan 3;13(1):e0006822. doi: <https://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0006822>

28. Landmann F. *The Wolbachia endosymbionts*. *Microbiol Spectr*. 2019 Mar;7(2). doi: <https://dx.doi.org/10.1128/microbiolspec.BAI-0018-2019>

29. Olanratmanee P, Baimai V, Ahantarig A, Trinachartvanit W. *Novel supergroup U Wolbachia in bat mites of Thailand*. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 2021 Feb;52:48-55.

30. Werren JH, Baldo L, Clark ME. *Wolbachia: master manipulators of invertebrate biology*. *Nat Rev Microbiol*. 2008 Oct;6(10):741-51. doi: <https://dx.doi.org/10.1038/nrmicro1969>

31. Hoffmann AA, Ross PA, Rašić G. *Wolbachia strains for disease control: ecological and evolutionary considerations*. *Evol Appl*. 2015 Sep;8(8):751-68. doi: <https://dx.doi.org/10.1111/eva.12286>

32. Yen PS, Failloux AB. *A Review: Wolbachia-based population replacement for mosquito control shares common points with genetically modified control approaches*. *Pathogens*. 2020 May 22;9(5):404. doi: <https://dx.doi.org/10.3390/pathogens9050404>

33. Armbruster P, Damsky WE, Giordano R, Birungi J, Munstermann L, Conn J. *Infection of New- and Old-World Aedes albopictus (Diptera: Culicidae) by the intracellular*

parasite Wolbachia: Implications for host mitochondrial DNA evolution. *J Med Entomol*. 2003 May;40(3):356-360. doi: <https://dx.doi.org/10.1603/0022-2585-40.3.356>

34. Bourtzis K, Dobson SL, Xi Z, Rasgon JL, Calvitti M, Moreira LA et al. *Harnessing mosquito-Wolbachia symbiosis for vector and disease control*. *Acta Trop*. 2014 Apr;132 Suppl:S150-163. doi: <https://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2013.11.004>

35. Zhou W, Rousset F, O'Neill S. *Phylogeny and PCR-based classification of Wolbachia strains using wsp gene sequences*. *Proc Biol Sci*. 1998 Mar 22;265(1395):509-515. doi: <https://dx.doi.org/10.1098/rspb.1998.0324>

36. Kaur R, Shropshire JD, Cross, KL, Leigh B, Mansueto AJ, Stewart V et al. *Living in the endosymbiotic world of Wolbachia: A centennial review*. *Cell Host Microbe*. 2021 Jun 9;29(6):879-893. doi: <https://dx.doi.org/10.1016/j.chom.2021.03.006>

37. Calvitti M, Moretti R, Lampazzi E, Bellini R, Dobson SL. *Characterization of a new Aedes albopictus (Diptera: Culicidae)-Wolbachia pipientis (Rickettsiales: Rickettsiaceae) symbiotic association generated by artificial transfer of the wPip strain from Culex pipiens (Diptera: Culicidae)*. *J Med Entomol*. 2010 Mar;47(2):179-187. doi: <https://dx.doi.org/10.1603/me09140>

38. Caputo B, Moretti R, Manica M, Serini P, Lampazzi E, Bonanni M et al. *A bacterium against the tiger: preliminary evidence of fertility reduction after release of Aedes albopictus males with manipulated Wolbachia infection in an Italian urban area*. *Pest Manag Sci*. 2020 Apr;76(4):1324-1332. doi: <https://dx.doi.org/10.1002/ps.5643>

39. Ahmad NA, Vythilingam I, Lim YAL, Zabari NZAM, Lee HL. *Detection of Wolbachia in Aedes albopictus and their effects on chikungunya virus*. *Am J Trop Med Hyg*. 2017 Jan 11;96(1):148-156. doi: <https://dx.doi.org/10.4269/ajtmh.16-0516>

40. Schaffner F, Angel G, Geoffroy B, Hervy JO, Rhaeim A. *The mosquitoes of Europe/Les moustiques d'Europe. An identification and training programme/Logiciel d'identification et d'enseignement*. Didactiques. Montpellier:IRD Editions & EID Méditerranée. 2001.

41. Carvajal TM, Hashimoto K, Harnandika RK, Amlin DM, Watanabe K. *Detection of Wolbachia in field-collected Aedes aegypti mosquitoes in metropolitan Manila, Philippines*. Parasit Vectors. 2019 Jul 24;12(1):361. doi: <https://dx.doi.org/10.1186/s13071-019-3629-y>
42. Wu Y, Zheng X, Zhang M, He A, Li Z, Zhan X. *Cloning and functional expression of Rh50-like glycoprotein, a putative ammonia channel, in Aedes albopictus mosquitoes*. J Insect Physiol. 2010 Nov;56(11):1599-610. doi: <https://dx.doi.org/10.1016/j.jinsphys.2010.05.021>
43. Staden R, Beal KF, Bonfield JK. *The Staden package, 1998*. Methods Mol Biol. 2000;132:115-30. doi: <https://dx.doi.org/10.1385/1-59259-192-2:115>
44. Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. *Basic local alignment search tool*. J Mol Biol. 1990 Oct 5;215(3):403-410. doi: [https://dx.doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://dx.doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2)
45. Tamura K, Stecher G, Kumar S. *MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11*. Mol Biol Evol. 2021 Jun 25;38(7):3022-3027. doi: <https://dx.doi.org/10.1093/molbev/msab120>
46. Tsai KH, Lien JC, Huang CG, Wu WJ, Chen WJ. *Molecular (Sub)grouping of endosymbiont Wolbachia Infection among mosquitoes of Taiwan*. J Med Entomol. 2004 Jul;41(4):677-683. doi: <https://dx.doi.org/10.1603/0022-2585-41.4.677>
47. Mavingui P, Moro CV, Tran-Van V, Wisniewski-Dyé F, Raquin V, Minard G et al. *Whole-genome sequence of Wolbachia strain wAlbB, an endosymbiont of tiger mosquito vector Aedes albopictus*. J Bacteriol. 2012 Apr;194(7):1840. doi: <https://dx.doi.org/10.1128/JB.00036-12>
48. Braig HR, Zhou W, Dobson SL, O'Neill SL. *Cloning and characterization of a gene encoding the major surface protein of the bacterial endosymbiont Wolbachia pipientis*. J Bacteriol. 1998 May;180(9):2373-2378. doi: <https://dx.doi.org/10.1128/jb.180.9.2373-2378.1998>
49. Noda H, Miyoshi T, Zhang Q, Watanabe K, Deng K, Hoshizaki S. *Wolbachia infection shared among planthoppers (Homoptera: Delphacidae) and their endoparasites (Strepsiptera: Elenchidae): a probable case of interspecies transmission*. Mol Ecol. 2001 Aug;10(8):2101-2106. doi: <https://dx.doi.org/10.1046/j.0962-1083.2001.01334.Xx>
50. Kittayapong P, Jamnongluk W, Thipaksorn A, Milne JR, Sindhusake C. *Wolbachia infection complexity among insects in the tropical rice-field community*. Wolbachia infection complexity among insects in the tropical rice-field community. doi: <https://dx.doi.org/10.1046/j.1365-294X.2003.01793.x>
51. Paupy C, Delatte H, Bagny L, Corbel V, Fontenille D. *Aedes albopictus, an arbovirus vector: from the darkness to the light*. Microbes Infect. 2009 Dec;11(14-15):1177-1185. doi: <https://dx.doi.org/10.1016/j.micinf.2009.05.005>
52. Calvitti M, Moretti R, Skidmore AR, Dobson SL. *Wolbachia strain wPip yields a pattern of cytoplasmic incompatibility enhancing a Wolbachia-based suppression strategy against the disease vector Aedes albopictus*. Parasit Vectors. 2012 Nov 12;5:254. doi: <https://dx.doi.org/10.1186/1756-3305-5-254>
53. Moretti R, Calvitti M. *Male mating performance and cytoplasmic incompatibility in a wPip Wolbachia trans-infected line of Aedes albopictus (Stegomyia albopicta)*. Med Vet Entomol. 2013 Dec;27(4):377-386. doi: <https://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2915.2012.01061.x>
54. Tortosa P, Charlat S, Labbé P, Dehecq JS, Barré H, Weill M. *Wolbachia age-sex-specific density in Aedes albopictus: A host evolutionary response to cytoplasmic incompatibility?* PLoS One. 2010 Mar 16;5(3):e9700. doi: <https://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0009700>
55. Hu Y, Xi Z, Liu X, Wang J, Guo Y, Ren D et al. *Identification and molecular characterization of Wolbachia strains in natural populations of Aedes albopictus in China*. Parasit Vectors. 2020 Jan 14;13(1):28. doi: <https://dx.doi.org/10.1186/S13071-020-3899-4>
56. Zhang D, Zhan X, Wu X, Yang X, Liang G, Zheng Z et al. *A field survey for Wolbachia and phage WO infections of Aedes albopictus in Guangzhou City, China*. Parasitol Res. 2014 Jan;113(1):399-404. doi: <https://dx.doi.org/10.1007/S00436-013-3668-9>
57. Kittayapong P, Baimai V, O'Neill SL. *Field prevalence of Wolbachia in the mosquito vector Aedes albo-*

pictus. Am J Trop Med Hyg. 2002 Jan;66(1):108-111. doi: <https://dx.doi.org/10.4269/ajtmh.2002.66.108>

58. Park CH, Lim HW, Kim HW, Lee WG, Roh JY, Park MY, Shin EH. High prevalence of *Wolbachia* infection in Korean populations of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae). J. Asia. Pac. Entomol. 2016 March; 19(1):191-194. doi: <https://dx.doi.org/10.1016/j.aspen.2015.12.014>

59. Anderson M, Rustin R, Eremeeva M. Pilot survey of mosquitoes (Diptera: Culicidae) from southeastern Georgia, USA for *Wolbachia* and *Rickettsia felis* (Rickettsiales: Rickettsiaceae). Vector Borne Dis. 2019 Apr-Jun;56(2):92-97. doi: <https://dx.doi.org/10.4103/0972-9062.263714>

60. De Albuquerque AL, Magalhães T, Ayres CFJ. High prevalence and lack of diversity of *Wolbachia pipientis* in *Aedes albopictus* populations from Northeast Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2011 Sep;106(6):773-776. doi: <https://dx.doi.org/10.1590/S0074-02762011000600021>

61. Torres-Monzón JA, Casas-Martínez M, López-Ordóñez T. Infection of *Aedes* mosquitoes by native *Wolbachia* in urban cemeteries of Southern Mexico. Salud Publica Mex. 2020 Jul-Aug;62(4):447-449. doi: <https://dx.doi.org/10.21149/10163>

62. Minard G, Tran FH, Van VT, Goubert C, Bellet C, Lambert G et al. French invasive Asian tiger mosquito populations harbor reduced bacterial microbiota and genetic diversity compared to Vietnamese autochtho-

nous relatives. Front Microbiol. 2015 Sep 22;6:970. doi: <https://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2015.00970>

63. 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 Mar;32(1):1-11. doi: <https://dx.doi.org/10.2987/moco-32-01-1-11.1>

64. Calvitti M, Moretti R, Porretta D, Bellini R, Urbanelli S. Effects on male fitness of removing *Wolbachia* infections from the mosquito *Aedes albopictus*. Med Vet Entomol. 2009 Jun;23(2):132-140. doi: <https://dx.doi.org/10.1111/J.1365-2915.2008.00791.x>

65. Regulation (EU) N° 528/2012 of the European Parliament and of the Council of 22 May 2012 concerning the making available on the market and use of biocidal products. [consultado 1 junio 2022]. Disponible en: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/en/TXT/?uri=CELEX%3A32012R0528>

66. Commission Implementing Decision (EU) 2018/1623 of 29 October 2018 pursuant to Article 3(3) of Regulation (EU) N° 528/2012 of the European Parliament and of the Council on mosquitoes non-naturally infected with *Wolbachia* used for vector control purposes. [consultado 1 junio 2022]. Disponible en: https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=uriserv%3AOJ.L_.2018.271.01.0030.01.ENG&toc=O-J%3AL%3A2018%3A271%3ATOC

Anexo I
 Perfil demográfico (sexo, código de distrito, ubicación), estado de detección de *Wolbachia* y clasificación de supergrupo para todos los mosquitos *Aedes albopictus* adultos individuales utilizados en este estudio.

Muestra	Sexo	Sitio	Coordenadas		wAlbA	wAlbB	Infección
			Latitud	Longitud			
ALB1WOL1F	F	D1	39,4727	-0.3695	+	+	AB
ALB1WOL1M	M	D1	39,4727	-0.3695	+	+	AB
ALB2WOL1F	F	D2	39,4589	-0.3759	+	+	AB
ALB2WOL1M	M	D2	39,4589	-0.3759	+	-	A
ALB3WOL1F	F	D3	39,4769	-0.3867	+	+	AB
ALB3WOL1M	M	D3	39,4769	-0.3867	-	+	B
ALB3WOL2M	M	D3	39,4769	-0.3867	-	+	B
ALB4WOL1F	F	D4	39,4916	-0.4036	+	+	AB
ALB4WOL1M	M	D4	39,4916	-0.4036	+	+	AB
ALB5WOL1F	F	D5	39,4869	-0.382	+	-	A
ALB5WOL1M	M	D5	39,4869	-0.382	+	+	AB
ALB5WOL2M	M	D5	39,4869	-0.382	-	+	B
ALB6WOL1F	F	D6	39,4776	-0.3641	+	-	A
ALB6WOL1M	M	D6	39,4776	-0.3641	-	+	B
ALB7WOL1F	F	D7	39,4667	-0.3958	+	+	AB
ALB7WOL2F	F	D7	39,4667	-0.3958	-	-	0
ALB7WOL1M	M	D7	39,4667	-0.3958	+	+	AB
ALB8WOL1F	F	D8	39,4531	-0.4043	+	-	A
ALB8WOL2F	F	D8	39,4531	-0.4043	+	+	AB
ALB8WOL1M	M	D8	39,4531	-0.4043	-	-	0
ALB9WOL1F	F	D9	39,4446	-0.3944	+	+	AB
ALB9WOL1M	M	D9	39,4446	-0.3944	+	+	AB
ALB9WOL2M	M	D9	39,4446	-0.3944	+	+	AB
ALB10WOL1F	F	D10	39,4444	-0.3661	+	+	AB
ALB10WOL2F	F	D10	39,4444	-0.3661	+	+	AB

Infecciones por *Wolbachia pipiensis* en poblaciones de *Aedes albopictus* en la ciudad de Valencia (España): implicaciones para el control de mosquitos

RUBÉN
BUENO-MARI
et al.

Perfil demográfico (sexo, código de distrito, ubicación), estado de detección de *Wolbachia* y clasificación de supergrupo para todos los mosquitos *Aedes albopictus* adultos individuales utilizados en este estudio.

Muestra	Sexo	Sitio	Coordenadas		wAlbA	wAlbB	Infección
			Latitud	Longitud			
ALB10WOL1M	M	D10	39,4444	-0.3661	-	+	B
ALB11WOL1F	F	D11	39,4666	-0.3267	+	+	AB
ALB11WOL1M	M	D11	39,4666	-0.3267	-	+	B
ALB12WOL1F	F	D12	39,4673	-0.34	+	+	AB
ALB12WOL1M	M	D12	39,4673	-0.34	-	+	B
ALB13WOL1F	F	D13	39,4733	-0.3425	+	+	AB
ALB13WOL1M	M	D13	39,4733	-0.3425	+	+	AB
ALB14WOL1F	F	D14	39,4816	-0.358	+	+	AB
ALB14WOL1M	M	D14	39,4816	-0.358	+	+	AB
ALB15WOL1F	F	D15	39,493	-0.3815	+	+	AB
ALB15WOL1M	M	D15	39,493	-0.3815	+	+	AB
ALB16WOL1F	F	D16	39,4984	-0.3962	+	+	AB
ALB16WOL2F	F	D16	39,4984	-0.3962	+	+	AB
ALB16WOL3F	F	D16	39,4984	-0.3962	+	+	AB
ALB16WOL4F	F	D16	39,4984	-0.3962	+	+	AB
ALB16WOL1M	M	D16	39,4984	-0.3962	+	+	AB
ALB16WOL2M	M	D16	39,4984	-0.3962	+	+	AB
ALB16WOL3M	M	D16	39,4984	-0.3962	-	-	O
ALB16WOL4M	M	D16	39,4984	-0.3962	+	+	AB
ALB17WOL1F	F	D17	39,5229	-0.3784	+	+	AB
ALB17WOL1M	M	D17	39,5229	-0.3784	+	+	AB
ALB18WOL1F	F	D18	39,5018	-0.4241	+	+	AB
ALB18WOL1M	M	D18	39,5018	-0.4241	-	+	B
ALB19WOL1F	F	D19	39,4222	-0.3396	+	+	AB
ALB19WOL1M	M	D19	39,4222	-0.3396	-	+	B

Infecciones por *Wolbachia pipientis* en poblaciones de *Aedes albopictus* en la ciudad de València (España): implicaciones para el control de mosquitos

RUBÉN BUENO-MARÍ et al.