

CONTROL BIOLÒGIC DEL DENGUE AMB *WOLBACHIA*

ESTEVA GELABERT, TERESA¹; FARFÁN SELLARÉS, MARIBEL

Secció de Microbiologia, Departament de Biologia, Sanitat i Medi Ambient,
Facultat de Farmàcia i Ciències de l'Alimentació, Universitat de Barcelona
Av. Joan XXIII 27-31, 08028 Barcelona

Abstract

Dengue is one of the most significant infectious diseases caused by an arbovirus worldwide. The etiologic agent is the dengue virus and it is transmitted through the bite of the *Aedes aegypti*, or yellow fever mosquito. Infections can be asymptomatic or vary from mild symptomatology to potentially deadly cases known as severe dengue. The lack of any effective treatment and the development of a universal vaccine mean this disease has a huge sanitary, social and economic impact. *Wolbachia* is a bacteria that establishes an endosymbiotic relationship with arthropods and nematodes, causing reproductive alterations within them. Therefore, when *Wolbachia* infects *Aedes aegypti*, it has the capacity to increase the death rate of adult mosquitoes and reduce the replication of the dengue virus. The World Mosquito Program has now shown this biological method of controlling mosquito-transmitted diseases to be feasible, applicable over large territorial areas, and that it could reduce the threat of other diseases transmitted by mosquitoes.

Keywords: dengue, *Wolbachia*, *Aedes aegypti*.

Resumen

El dengue es una de las enfermedades infecciosas más importantes causada por un arbovirus a nivel mundial. El agente etiológico es el virus del dengue y se transmite mediante la picadura del vector *Aedes aegypti*. La infección puede ser asintomática o variar desde una sintomatología leve a un caso grave mortal conocido como dengue grave. La ausencia de un tratamiento efectivo y el desarrollo de una vacuna universal provocan que esta enfermedad suponga un gran impacto sanitario, social y económico. *Wolbachia* es una bacteria que establece una relación de endosimbiosis con artrópodos y nematodos, en los que produce alteraciones reproductivas. Por eso, cuando *Wolbachia* infecta a *Aedes aegypti* tiene la capacidad de aumentar la mortalidad en los mosquitos adultos y disminuir la replicación del virus del dengue. Actualmente, el World Mosquito Program ha demostrado que el método de control biológico con *Wolbachia* es factible, aplicable en grandes áreas y, además, puede reducir la amenaza de sufrir otras enfermedades transmitidas por mosquitos.

Palabras clave: dengue, *Wolbachia*, *Aedes aegypti*.

Resum

El dengue és una de les malalties infeccioses més importants a escala mundial i està causada per un arbovirus. L'agent etiològic és el virus del dengue i es transmet mitjançant la picada del vector *Aedes aegypti*. La infecció pot ser asintomàtica o bé pot variar des d'una simptomatologia lleu fins a un cas potencialment mortal conegut com a dengue greu. L'absència d'un tractament efectiu i el desenvolupament d'una vacuna universal provoquen que aquesta malaltia representi un gran impacte sanitari, social i econòmic. *Wolbachia* és un bacteri que estableix una relació d'endosimbiosi amb artròpodes i nematodes, en els quals actua produint alteracions reproductives. Per això, quan *Wolbachia* infecta *Aedes aegypti*, té la capacitat d'augmentar la mortalitat en els mosquits adults i disminuir la replicació del virus del dengue. Actualment, el World Mosquito Program ha demostrat que el mètode de control biològic amb *Wolbachia* és factible, és aplicable a grans àrees i, a més, pot reduir l'amenaça de patir altres malalties transmeses per mosquits.

Paraules clau: dengue, *Wolbachia*, *Aedes aegypti*.

¹ Graduada en Farmàcia (teresaestevagelabert@gmail.com).

1. Introducció

El dengue és una malaltia infecciosa vírica transmesa per la picada d'un mosquit femella infectat. El vector pertany al gènere *Aedes* i en la majoria dels casos els responsables de transmetre el virus del dengue són l'espècie *Aedes aegypti* i, en menor proporció, l'*Aedes albopictus*. Aquest gènere de mosquits també és l'encarregat de transmetre altres virus infecciosos, com ara el virus del Zika, el del *chikungunya* i el de la febre groga (OMS, 2018a).

La majoria de les infeccions causades pel virus del dengue són asimptomàtiques i, en el cas que es manifesti, la simptomatologia pot variar des d'una febre lleu fins a la mort. Depenent de com evolucioni la infecció, el sistema immunitari de l'hoste i quines siguin les manifestacions clíniques, parlarem del dengue o del dengue greu (Tortora, 1993,). En el cas del dengue, els símptomes són similars als d'una síndrome pseudogripal. Si la malaltia es complica, derivarà en una situació de dengue greu potencialment mortal. Actualment no existeix un tractament antiviral específic per al dengue (OMS, 2018a).

El dengue és una malaltia que afecta principalment regions tropicals o subtropicals del nostre planeta. És endèmic en més de cent països d'Àfrica, Amèrica, el Mediterrani oriental, l'Àsia sud-oriental i el Pacífic occidental. Sobretot el trobem en zones urbanes o periurbanes pobres i zones rurals (OMS, 2018a). Segons estudis recents, s'ha pogut predir que en les últimes dècades la incidència d'aquesta malaltia s'ha incrementat mundialment i pot arribar a causar més de 390 milions d'infeccions cada any, de les quals 96 milions es manifestaran clínicament (Bhatt, 2013). Sense anar més lluny, durant el 2018 es va diagnosticar per primer cop un cas autòcton de dengue a Catalunya, el sisè cas en tot l'Estat espanyol. Es va tractar d'un home jove que resideix al Barcelonès nord i que no va viatjar a cap zona endèmica ni a cap altre territori espanyol (Generalitat de Catalunya, 2018).

2. Metodologia

La metodologia emprada s'ha basat a realitzar una cerca bibliogràfica a partir de diferents fonts d'informació. Primer es van consultar diferents llibres disponibles a la biblioteca de la Facultat de Farmàcia i Ciències de l'Alimentació. En segon lloc, es van visitar les pàgines web oficials de les diferents organitzacions sanitàries més importants a escala mundial, juntament amb la plataforma web del World Mosquito Program. També es va visitar la plataforma Pubmed, que ens permet accedir als diferents articles de *Medline*, i la base de dades Scopus. Finalment, com que va ser durant l'any 2018 quan es va notificar el primer cas de dengue autòcton a Catalunya, s'han consultat les pàgines web de la Generalitat de Catalunya i altres pàgines de fonts divulgatives.

3. Desenvolupament del treball

3.1. El dengue

3.1.1. L'agent etiològic

El dengue és una malaltia causada per un virus que pertany al gènere *Flavivirus* (família *Flaviviridae*). Aquest gènere està compost per virus ARN que transmeten principalment mosquits i paparres. Per aquest motiu, els flavivirus també es classifiquen com a arbovirus, ja que es transmeten a través de vectors artròpodes (Murray, 1990; Messina, 2014).

El virió del dengue té un genoma ARN monocatenari de polaritat positiva d'una longitud d'11 Kb, una càpsida icosaèdrica i una envolta (Murray, 1990). Tot el genoma del virus del dengue es tradueix en una única poliproteïna a partir de la qual s'obtenen tres proteïnes estructurals i set proteïnes no estructurals (OMS i TDR, 2009; Guzman, 2010).

En el cicle de replicació, el virus del dengue s'uneix a la cèl·lula de l'hoste i hi penetra mitjançant una endocitosi mediada per receptors. Tot seguit té lloc la internalització i l'acidificació de l'endosoma, que provoca la fusió de les membranes víriques i vesiculars amb l'objectiu d'alliberar la nucleocàpsida i el genoma del virus al citoplasma cel·lular. A partir d'aquí, en el reticle endoplasmàtic de la cèl·lula s'inicia la traducció del genoma del virus del dengue i l'acoblament de les diferents proteïnes estructurals i ARN virals. En aquest cas, el virus del dengue adquireix l'envolta per gemmació en el reticle endoplasmàtic i, un cop en l'aparell de Golgi, les partícules del virus del dengue maduren i obtenen la capacitat infectiva. Finalment, el virus és alliberat per exocitosi o per mecanismes de lisi cel·lular (Murray, Rosenthal i Pfaller, 1990; Mukhopadhyay, Kuhn i Rossmann, 2005, Clyde; Kyle i Harris, 2006).

Existeixen quatre serotips diferents del virus del dengue (DENV1, DENV2, DENV3 i DENV4), que es troben estretament relacionats entre ells (OMS i TDR, 2009). A causa d'aquesta variabilitat, patir la infecció d'un serotip determinat no confereix immunitat enfront dels altres tres serotips. Per això, el tipus de serotip és un factor de risc que cal tenir en compte, ja que depenent de la classe de virus que causi la infecció o de si hi ha infeccions secundàries, l'evolució de la malaltia serà diferent (OMS i TDR, 2009; Messina, 2014).

3.1.2. Transmissió del virus del dengue

Actualment hi ha dos vectors que transmeten la malaltia del dengue. El vector principal és el mosquit *Aedes aegypti* i el vector secundari és el mosquit *Aedes albopictus* (OMS, 2018a).

Aedes aegypti és una espècie antropòfila, tropical i subtropical, present a tot el món i adaptada a l'entorn urbà, pròxima als habitatges humans. Els mosquits es troben en les seves formes immadures en l'aigua, sobretot en recipients artificials externs (OMS, 2017). Morfològicament, *Aedes aegypti* és de color negre, consta d'uns anells blancs a les cames i es pot apreciar un patró en forma de lira platejada a la part superior dorsal del tòrax (*Comparison dengue vectors*, 2012).

Aedes albopictus, conegut comunament com el mosquit tigre, és el vector secundari que transmet el virus del dengue. Aquesta espècie i els seus ous tenen la capacitat de sobreviure en temperatures inferiors a les que tolera *Aedes aegypti*, per això el trobem estès en zones de l'hemisferi nord (Kyle i Harris, 2008). En aquest cas, *Aedes albopictus* també és de color negre i té a les cames uns anells blancs. Morfològicament és molt similar a *Aedes aegypti*, però es diferencia d'aquesta espècie en el fet que només té una línia platejada en el centre del dors del tòrax (*Comparison dengue vectors*, 2012).

En el cicle de transmissió del dengue, l'ésser humà és el principal hoste amplificador del virus. Un cop el virus circula per la sang dels humans, pot ser ingerit pels mosquits femella en el procés de l'alimentació durant el període de virèmia. A partir d'aquí, el virus del dengue infecta el tracte intestinal del mosquit i, posteriorment, es produeix la propagació sistèmica fins a les glàndules salivals. Una vegada passat el període d'incubació extrínsec, el mosquit tindrà la capacitat infecciosa de transmetre el virus del dengue durant la resta de la seva vida. Per mitjà de la picada s'inicia la infecció i, un cop a la pell, el virus del dengue infecta les cèl·lules dendrítiques immadures del sistema immunitari, que posteriorment maduraran i migraran als ganglis limfàtics, on s'originarà la resposta immunitària de l'hoste. També hi ha evidència d'una abundant replicació del virus del dengue en les cèl·lules parenquimàtiques hepàtiques, en els monòcits de la sang perifèrica i en els macròfags de ganglis limfàtics, fetge i melsa (Murray, 1990; OMS i TDR, 2009; Guzman, 2010).

3.1.3. Manifestacions clíniques i complicacions

La malaltia del dengue pot afectar nadons, nens i també adults. Diversos factors de risc poden determinar el curs de la malaltia i fer que les manifestacions clíniques siguin lleus, greus i molt greus. Un cop la persona ha estat infectada amb el virus del dengue i ha passat el període d'incubació, la malal-

tia comença abruptament i es poden distingir tres fases: una fase febril inicial, una fase crítica i, finalment, una fase de recuperació (figura 1).

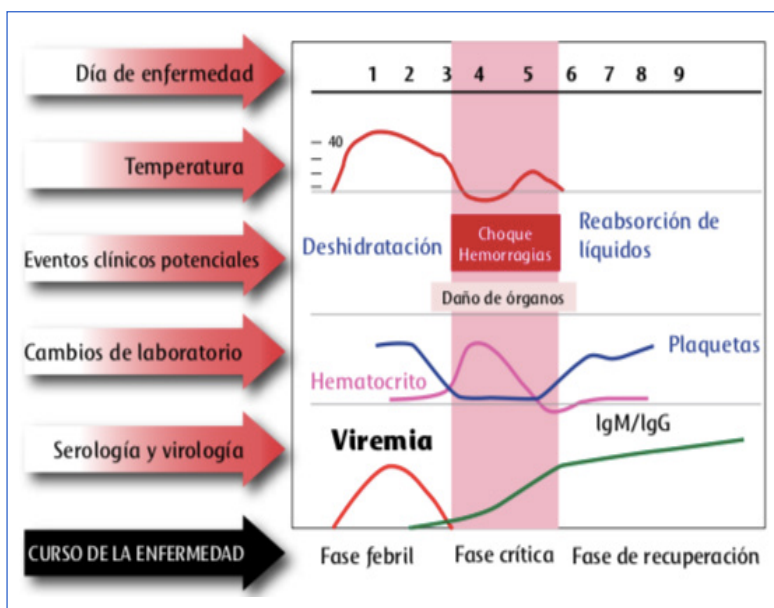


Figura 1. Dengue, curs de la malaltia. Font: *Dengue: guías para la atención de enfermos en la región de las Américas* (OPS i OMS, 2015).

La fase febril inicial es caracteritza per la presència de febre elevada ($\geq 38,5$ °C) acompanyada d'altres símptomes com ara: cefalea, nàusees, vòmits, miàlgia, artràlgia, inflamació dels ganglis limfàtics, fetge palpable, etc. A més, poden aparèixer alguns trastorns sanguinis menors, com ara petèquies, sagnat de les mucoses i aparició d'hematomes. Les analítiques demostren una disminució progressiva del recompte total de glòbuls blancs, una elevació de l'aminotransferasa hepàtica i, en alguns casos, trombocitopènia lleu.

Durant la fase crítica, normalment la febre disminueix fins als 37,5-38 °C. En alguns casos, quan baixa la febre, el pacient amb dengue pot millorar i recuperar-se, però si no s'aprecia una millora s'ha de sospitar que ens trobem en una fase de major gravetat. En aquesta fase més greu apareix la síndrome de permeabilitat capil·lar, caracteritzada per la fuga del plasma, leucopènia i trombocitopènia severa. A més, aquesta síndrome es troba evidenciada per un increment en el valor de l'hematòcrit, vessaments pleurals i ascites. Les manifestacions hemorràgiques són molt comunes en aquest període de la malaltia. Finalment, quan hi ha una pèrdua crítica del volum plasmàtic a causa de l'extravasació del plasma, es diagnostica la síndrome de xoc per dengue, la qual produeix un deteriorament orgànic progressiu, dificultat respiratòria, acidosi metabòlica i hemorràgies greus.

Passada la fase crítica, ens trobem en la fase de recuperació, on la permeabilitat vascular retorna espontàniament al seu nivell normal. Es produeix la reabsorció gradual dels líquids del compartiment extravascular, procés que sol anar acompanyat d'una millora ràpida dels símptomes que presenta el pacient. Normalment l'hematòcrit s'estabilitza, el nombre de glòbuls blancs comença a pujar i posteriorment el nombre de plaquetes circulants s'incrementa ràpidament (OMS i TDR, 2009; Simons. 2012; OPS i OMS, 2015).

3.1.4. Classificació dels casos de dengue

Segons la classificació de l'OMS, el conjunt de signes i símptomes descrits durant la fase febril coincideixen amb la descripció clínica del dengue sense senyals d'alarma. Aquest quadre clínic és autolimitat i típic dels adults que viuen o han viatjat a zones on el dengue és endèmic. Seguint amb la classifi-

cació de l'OMS, hem de tenir en compte que si el pacient presenta senyals d'alarma, el quadre clínic serà descrit com a dengue amb senyals d'alarma. Finalment, en el cas que el pacient es trobi en perill de mort imminent i presenti signes o símptomes d'una complicació que pugui ser mortal (xoc o dificultat respiratòria, sagnat important i compromís greu dels òrgans), parlarem de dengue greu (OMS i TDR, 2009; OPS i OMS, 2015).

3.1.5. Proves diagnòstiques

El diagnòstic del dengue s'estableix mitjançant la detecció directa dels components virals en les mostres o bé de manera indirecta per mètodes serològics. Depenent de la fase de la malaltia en què ens trobem, les tècniques de detecció variaran. Durant els primers dies, el virus es pot detectar en el sèrum, el plasma, les cèl·lules sanguínies i els teixits, mitjançant l'aïllament directe del virus, la detecció de l'àcid nucleic i la detecció dels antígens. Ara bé, al final de la fase aguda la serologia és el mètode d'elecció per realitzar el diagnòstic (Simmons, 2012).

El diagnòstic serològic es basa en la detecció dels nivells elevats d'anticossos. Si el pacient pateix una infecció primària per dengue, la immunoglobulina M (IgM) és la primera immunoglobulina que apareix. Es caracteritza per tenir una resposta lenta i a baixa concentració, però a partir dels 3-5 dies d'infecció anirà augmentant progressivament. Un cop passada aquesta fase, disminueix fins a nivells indetectables durant els propers mesos. La IgG específica del dengue apareix en concentracions baixes un cop ha passat la primera setmana de la malaltia i augmenta lentament en els pròxims dies. Per contra, en una infecció secundària, els nivells de IgG es poden detectar fàcilment durant la fase aguda de la malaltia, ja que augmenten bruscament durant les primeres setmanes i predominen per sobre de les IgM. Durant la infecció secundària, els nivells de IgM són significativament més baixos (Guzman, 2010).

Per detectar els anticossos s'utilitza la tècnica MAC-ELISA, que s'ha convertit en una de les eines més importants en el diagnòstic rutinari del dengue. Recentment, s'han identificat alguns tests de IgM disponibles comercialment amb unes característiques acceptables per realitzar el diagnòstic del dengue (Guzman i Kourí, 2004; OMS i TDR, 2009; Simmons, 2012).

3.1.6. Tractament

Actualment no hi ha un tractament antiviral efectiu per a la infecció del dengue, però sí que es poden tractar els símptomes, fent especial èmfasi a mantenir el volum de líquid corporal. Si el pacient no pateix cap complicació i té la capacitat de tolerar fluids orals i orinar correctament, pot romandre a casa. Com a tractament es recomana la ingesta d'una solució de rehidratació oral i administrar paracetamol per a la febre elevada. En el cas que aparegui algun senyal d'advertència, es procedirà a l'hospitalització del pacient i se li administraran líquids per via parenteral. Si s'avança fins a la síndrome de xoc per dengue, és imprescindible restablir el volum del plasma i administrar de manera contínua una teràpia amb fluids per donar suport a la circulació i mantenir la perfusió de sang als òrgans vitals. Per als pacients amb dengue greu poden ser necessaris alguns tractaments coadjuvants, entre els quals trobem teràpies de substitució renal i tractaments addicionals a causa de la deficiència d'alguns òrgans (OMS i TDR, 2009; Simmons, 2012; OMS, 2018a).

3.1.7. Vacunes

La vacuna principal per al dengue ha estat desenvolupada durant més de vint anys per Sanofi Pasteur i es coneix amb el nom de CYD-TVD o Dengvaxia®. Aquesta vacuna conté virus vius atenuats en una formulació quimèrica tetravalent. Com que hi ha quatre classes de virus del dengue, les vacunes han de ser tetravalents per poder protegir contra tots els serotips. La vacuna CYD-TVD va demostrar que

s'obtenen respostes neutralitzades i equilibrades enfront dels anticossos dels quatre serotips. Per això està autoritzada en vint països on es van portar a terme assajos clínics dissenyats per determinar l'eficàcia de la vacuna administrant tres dosis amb una separació de sis mesos entre elles (OMS i TDR, 2009; Simmons, 2012).

El 2016 l'OMS va recomanar la introducció de la vacuna en àrees geogràfiques on el dengue és endèmic i hi existeixi una seroprevalença superior o igual al 70%. Ara bé, el 2017 Sanofi Pasteur va avaluar les dades obtingudes d'una anàlisi de seguretat i eficàcia a llarg termini de Dengvaxia® en persones seropositives i seronegatives, i els resultats van demostrar que el benefici de la vacunació a la població continua sent favorable, però la vacuna funciona de manera diferent depenent de si els individus han estat infectats amb el dengue o no prèviament a la vacunació. El 2018, un cop evidenciat el problema de seguretat de la vacuna del dengue a llarg termini en individus seronegatius, el Grup d'Experts en Assessorament Estratègic (SAGE), juntament amb l'OMS, van considerar una nova estratègia que es basa a portar a terme cribratges previs a la vacunació mitjançant proves serològiques de detecció d'anticossos per assegurar que només es vacunaran les persones seropositives per dengue que es trobin en l'interval d'edat d'entre 9 i 45 anys (OMS, 2018b).

3.2. «Wolbachia»

3.2.1. El bacteri endosimbiont d'artròpodes i nematodes

Wolbachia (classe *Alphaproteobacteria*, ordre *Rickettsiales*, família *Anaplasmataceae*, gènere *Wolbachia*) és un bacteri pleomòrfic que pot aparèixer en forma de bacil petit (0,5-1,3 µm de llargària) i també en forma coccoide (0,25-1 µm) (figura 2). És un bacteri intracel·lular gramnegatiu que creix i es multiplica per divisió binària en els vacúols de les cèl·lules de l'amfitrió (Garrity, 2001).

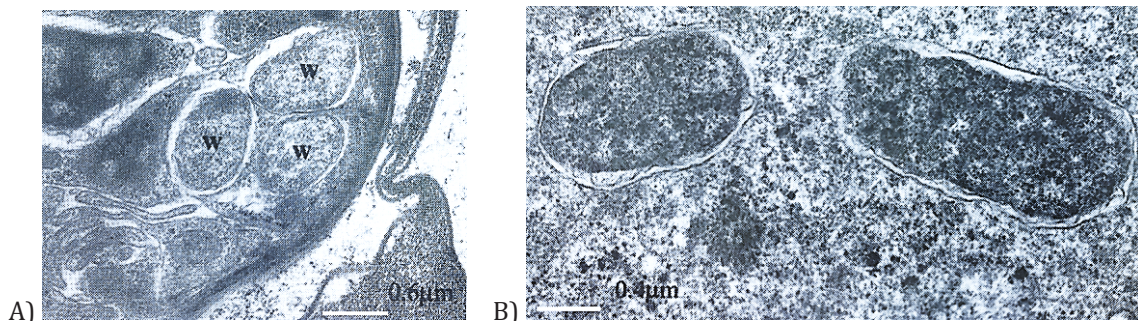


Figura 2. *Wolbachia pipientis* en nematodes filàries. (A) *Wolbachia* (W) dins un embrió de *D. immitis*. (B) Detalls dels endosimbionts de *Wolbachia* dins un oòcit de *Brugia pahangi*. Font: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol 2, part C* (Garrity, 2001) (imatge modificada).

Wolbachia es troba associat a la majoria d'espècies d'artròpodes i nematodes, amb els quals estableix una relació d'endosimbiosi. Una característica que cal destacar-ne és la capacitat de produir alteracions reproductives en els seus hosts. Per això en els artròpodes es troba en el citoplasma de les cèl·lules dels òrgans reproductors i en els nematodes la trobem en l'aparell reproductiu de la femella (Garrity, 2001).

Wolbachia pipientis és l'espècie tipus del gènere *Wolbachia*. Va ser identificada el 1924 en les cèl·lules del teixit ovàric del mosquit *Culex pipiens* i formalment descrita el 1936 per Hertig. Actualment també trobem incloses dins del gènere *Wolbachia* dues espècies més: *Wolbachia persica* i *Wolbachia melophagi*. No obstant això, estudis recents han comprovat que *Wolbachia persica* està mal classificada taxonòmicament i hauria de ser reclassificada com a *Francisella persica*. Pel que fa a la classificació taxonòmica de *Wolbachia melophagi*, encara està per determinar; ja que la seqüència del

gen 16s rADN mostra certa homologia amb el gen 16S rARN de les espècies del gènere *Bartonella* (Garrity 2001). En les últimes dècades, l'anàlisi filogenètica del gen 16S rARN i l'ús de la reacció en cadena de la polimerasa (PCR) han permès identificar un gran nombre de bacteris íntimament relacionats amb *Wolbachia pipientis*. Tots aquests bacteris es troben en un clade monofilètic compost per sis clústers principals definits com a supergrups A-F. A causa d'una certa incertesa sobre si aquests bacteris poden representar espècies diferents, la majoria d'investigadors es refereixen a elles simplement com a soques de *Wolbachia* (Garrity, 2001; Lo, 2007).

Wolbachia pipientis no és visible amb la tinció de Gram encara que tingui una estructura de paret cel·lular gramnegativa. Normalment, per a la tinció d'aquests microorganismes s'usa la tinció Giemsa o bé la Diff-Quick. Per aïllar el bacteri s'utilitzen línies cel·lulars entre les quals trobem la Aa23 i la C6/36 del mosquit *Aedes albopictus* (Garrity, 2001).

Les soques de *Wolbachia* més importants descrites en estudis de recerca són les varietats wAlbA, wAlbB, wMel i wMelPop. Per una banda, les soques wAlbA i wAlbB no causen cap dany a l'hoste i pertanyen als supergrups A i B, respectivament. Juntament amb la soca no virulenta wMel aïllada de *Drosophila melanogaster*, tenen una taxa de creixement més baixa en la majoria dels insectes. La soca wMelPop s'ha aïllat també de *Drosophila melanogaster*, però ha demostrat ser una soca agressiva per a l'hoste. La podem definir com una varietat virulenta que té una taxa de creixement molt elevada i que pot arribar a provocar la degeneració dels teixits de l'hoste i la mort consegüent (Joubert, 2016; Dorigatti, 2018).

3.2.2. Transmissió de *Wolbachia* i alteracions en el cicle reproductiu

Els endosimbionts de *Wolbachia* són els més predominants en els artròpodes i nematodes i infecten un gran nombre d'espècies arreu del món. *Wolbachia* es transmet mitjançant els ous verticalment a la descendència principalment per les femelles, fet que implica que els mascles no es troben involucrats en la seva transmissió. Per avaluar el paràmetre de freqüència d'infecció d'aquest bacteri i la seva distribució global, s'han portat a terme diverses metaanàlisis i revisions i s'ha estimat que es troba present en el 40-60% de la població d'insectes, incloent-hi algunes espècies de mosquits. A més, en els artròpodes s'ha demostrat que l'hoste pot estar infectat amb més d'un tipus de *Wolbachia* pertanyent a grups genèticament diferents. Depenent de la soca de *Wolbachia* i de l'espècie d'insecte infectat, *Wolbachia* actua alterant el fenotip reproductiu per donar a l'insecte un avantatge reproductiu enfront dels insectes no infectats. L'expressió del fenotip pot donar com a resultat la feminització, la partenogènesi, la matança dels mascles o bé, en la forma més comuna, la incompatibilitat citoplasmàtica (figura 3) (Garrity., 2001; Hilgenboecker, 2008; Werren, 2008; Zug, 2012; Dorigatti, 2018).

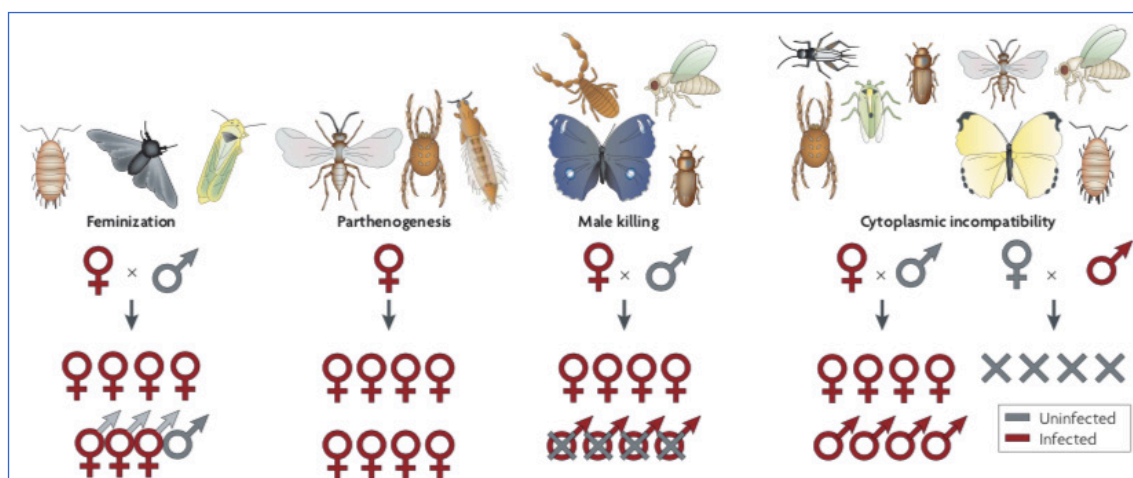


Figura 3. Fenotips induïts per *Wolbachia*. Font: *Wolbachia: master manipulators of invertebrate biology* (Werren, Baldo i Clark, 2008, pp. 741-751) (imatge modificada).

La incompatibilitat citoplasmàtica es basa en dos mecanismes principals: la modificació de l'esperma induïda per *Wolbachia* durant l'espermatogènesi i la capacitat de *Wolbachia* per revertir aquesta modificació en embrions fertilitzats infectats per la mateixa soca (Werren, 1997). Si l'esperma es troba modificada per una soca de *Wolbachia* que no es troba present en els ous de la femella, el desenvolupament embrionari és interromput i l'embrió mor. Aquest fet es produeix perquè els espermatozoides dels mascles infectats amb *Wolbachia* es troben modificats i s'impedeix la condensació o descondensació de la cromatina. Per tant, el cicle de les divisions cel·lulars no pot continuar correctament i es provoca un mal desenvolupament de l'embrió. Ara bé, quan es fusionen els ous d'una femella infectada amb *Wolbachia* i esperma infectada amb la mateixa soca o no, aquesta tindrà la capacitat de revertir la modificació present en l'embrió i així afavorir el desenvolupament embrionari correcte. D'aquesta manera, en reproduir-se un mascle i una femella infectats amb la mateixa soca de *Wolbachia*, la descendència es desenvoluparà correctament i serà portadora del bacteri (Werren, 2008; Timmer, 2011).

Els mascles infectats amb *Wolbachia* no la transmeten a la descendència, però podem dir que esterilitzen les femelles que no es troben infectades pel bacteri o que es troben colonitzades per una altra varietat de *Wolbachia*. Per tant, les femelles infectades amb la mateixa varietat de *Wolbachia* que el mascle tenen un avantatge reproductiu que fa viable la descendència i poden propagar-se en major nombre entre la població d'hostes (Garrity, 2001).

3.2.3. Interacció de *Wolbachia* amb *Aedes aegypti* i el virus del dengue

Entre les espècies de mosquits que naturalment es troben infectades amb *Wolbachia* trobem *Culex pipiens* i *Aedes albopictus*, però no hi trobem *Aedes aegypti*, vector principal que transmet el virus del dengue.

Per primer cop, l'any 2005 es va introduir artificialment per microinjecció *Wolbachia* (varietats wAlbA i wAlbB) aïllat del citoplasma dels òvuls de les femelles d'*Aedes albopictus* en *Aedes aegypti*. Després, el 2009 es va portar a terme la infecció dels ous d'*Aedes aegypti* amb la soca wMelPop extreta de la mosca de la fruita (*Drosophila melanogaster*), ja que es va observar que en les mosques de la fruita infectades amb la soca wMelPop augmentava la mortalitat en la població adulta, fet que va portar a desenvolupar noves hipòtesis per reproduir els mateixos resultats en els adults d'*Aedes aegypti*. D'aquesta manera es podrien utilitzar les propietats de *Wolbachia* com a mesura principal per controlar el dengue, atès que permetria reduir la densitat de la població de mosquits com a conseqüència de la disminució del temps de vida dels insectes adults infectats per dengue (Dorigatti, 2018).

La soca wMelPop no només va demostrar incrementar la mortalitat en la població adulta i disminuir la fecunditat de les femelles, sinó que també es va comprovar que afectava el comportament dels mosquits, atès que modificava factors com el nivell d'activitat i feia disminuir la conducta agressiva de la picada (Yeap, 2011). També es va provar de treballar amb una segona varietat de *Wolbachia* menys agressiva, coneguda com a *Wolbachia* wMel i extreta de *Drosophila melanogaster*. Les dues soques de *Wolbachia* van demostrar que permetien reduir dràsticament la població de mosquits, reduir la replicació del virus i eliminar el virus del dengue present en les glàndules salivals.

Els experiments realitzats en gàbies van demostrar que era viable passar del laboratori als desplegaments de camp. Tant els mosquits infectats amb wMel com els infectats amb wMelPop podrien envair poblacions de tipus salvatge i aconseguir altes freqüències d'infecció. El 2011 es van alliberar a la zona nord-est d'Austràlia tres-cents mil mosquits infectats amb *Wolbachia* i els estudis de seguiment van indicar que la infecció era estable i persistent (Dorigatti, 2018).

En diversos estudis amb *Drosophila* es va observar que *Wolbachia* tenia la capacitat de conferir una resistència addicional enfront dels virus ARN. Possiblement a causa de l'activació innata del sistema immunitari de l'insecte que reacciona enfront de *Wolbachia* i, conseqüentment, també contra el virus, a causa de l'increment en la producció de les espècies reactives d'oxigen o bé a causa de la com-

petència entre *Wolbachia* i el virus pels recursos que els ofereix la cèl·lula (Bian, 2010; Ferguson, 2015). En aquests últims anys també s'ha descobert que *Wolbachia* pot contribuir a la inhibició del virus del dengue utilitzant un microARN² de l'hoste. S'ha observat que el microARN *Aae-miR-2940* només es troba present en els mosquits infectats amb *Wolbachia* i que s'encarrega de suprimir l'expressió del gen ADN metiltransferasa *AaDnmt2*. Aquest gen inclou el control de diverses funcions biològiques, com ara la defensa de l'hoste, l'estabilitat del genoma, la regulació dels gens, la promoció del desenvolupament dels òrgans i la regulació del temps de vida. El virus del dengue també intervé en l'expressió del gen *AaDnmt2* i, inversament, a *Wolbachia* indueix una sobreexpressió. D'aquesta manera es va descobrir que una sobreexpressió del gen *AaDnmt2* promovia la replicació del virus del dengue i la inhibició de *Wolbachia*, mentre que una supressió en l'expressió d'aquest gen pel microARN *Aae-miR-2940* implicava la inhibició en el virus del dengue i la replicació de *Wolbachia*. Per això es va suggerir un vincle causal entre la manipulació de *Wolbachia* i el bloqueig de la replicació del virus del dengue (Zhang, 2013).

3.3. Estratègies de prevenció i control del dengue

Actualment, a causa de l'augment de la incidència i de la distribució geogràfica, els virus transmesos per mosquits són una preocupació global. Tot i que es coneixen des de fa dècades, avui en dia encara no tenim un tractament i un control adequats per al virus del dengue, el del Zika i el del *chikungunya*. Com a últim recurs per frenar la propagació d'aquests virus s'està estudiant com a primera eina el control dels vectors. Entre les diferents estratègies vectorials que trobem avui dia per aturar la transmissió d'aquestes malalties, cal destacar el control biològic amb *Wolbachia* (Schultz, 2018).

3.3.1. Control biològic amb *Wolbachia*: World Mosquito Program

El World Mosquito Program (WMP) es pot definir com una institució científica sense ànim de lucre operativa en diversos països que s'encarrega de limitar la transmissió de malalties vectorials alliberant al medi mosquits infectats amb *Wolbachia*. La incompatibilitat citoplasmàtica és el mecanisme que ens assegura que aquest bacteri s'establirà i es mantindrà en les poblacions de mosquits salvatges durant generacions un cop alliberat al medi. A més, també té la capacitat d'interferir en el cicle de replicació dels virus presents en *Aedes aegypti*, entre els quals trobem el virus del dengue, el del Zika i el del *chikungunya*.

Per implementar el WMP és necessari alliberar mosquits infectats amb *Wolbachia*, tant mascles com femelles, fins que la freqüència d'infecció del bacteri en *Aedes aegypti* arribi a un punt d'equilibri. Un cop s'ha superat aquest punt d'equilibri, s'espera que *Wolbachia* s'estableixi localment en una zona suficientment gran que li permetrà distribuir-se a àrees majors. Des dels alliberaments de mosquits infectats amb *Wolbachia* produïts el 2011 al nord-est d'Austràlia fins quatre anys després, s'ha demostrat que aquest bacteri es manté entre les poblacions de mosquits amb freqüències del 80-90 %, fet que cal destacar perquè implica que l'aplicació del WMP pot ser autosostenible i rendible.

Actualment, diverses proves pilot es porten a terme en diversos països entre els quals trobem Austràlia, Indonèsia, Vietnam, l'Índia, Sri Lanka, el Brasil, Colòmbia i Mèxic, entre d'altres, on la soca wMel ha demostrat que pot establir-se amb èxit entre les poblacions de mosquits salvatges (O'Neill, 2018).

² Els microARN o miARN són una classe conservada evolutivament de simples ARN amb vint-i-dos nucleòtids no codificants que regulen l'expressió del genoma a través dels seus gens diana. Participen en diversos processos cel·lulars, com ara el desenvolupament, la diferenciació, l'apoptosi i la immunitat (Zhang, 2013).

3.3.1.1. Alliberament a Townsville el 2014

El 2014 va tenir lloc l'alliberament gradual de mosquits infectats amb *Wolbachia* a la regió de Townsville (Queensland, zona nord-est d'Austràlia). L'objectiu d'aquest experiment era demostrar que el mètode de control biològic del dengue amb *Wolbachia* era factible a gran escala i que es podia realitzar de manera ràpida, poc costosa i acceptada per la comunitat. A més, tot i que no estava dissenyat com un assaig clínic, va permetre obtenir dades observacionals sobre la transmissió del dengue abans i després de l'inici del projecte (O'Neill, 2018).

El fet d'alliberar mosquits infectats amb *Wolbachia* al medi per eliminar el dengue podria representar un perill. Per això, abans de començar l'estudi es va fer una anàlisi de risc i es va observar que, tenint en compte que es tracta d'un bacteri omnipresent, els riscos ambientals i humans associats a la introducció de *Wolbachia* en zones rurals són mínims (Murray, 2016). A successful technology was developed with the stable introduction of the obligate intracellular bacteria *Wolbachia pipiensis* into the mosquito *Aedes aegypti* to reduce its ability to transmit dengue fever due to life shortening and inhibition of viral replication effects. An analysis of risk was required before considering release of the modified mosquito into the environment. METHODS Expert knowledge and a risk assessment framework were used to identify risk associated with the release of the modified mosquito. Individual and group expert elicitation was performed to identify potential hazards. A Bayesian network (BN.

Un cop realitzada l'anàlisi de risc, es va presentar la proposta d'alliberament del mosquit *Aedes aegypti* infectat amb *Wolbachia* a les autoritats legislatives i el Departament de Salut va ser la jurisdicció responsable d'aprovar el projecte. La proposta del projecte va revelar que hi havia un buit legal en el procés normatiu, ja que per molt que s'associessin *Aedes aegypti* i *Wolbachia*, es considerava que les dues espècies eren naturals d'Austràlia i, per tant, el fet no es podia considerar com a introducció d'una nova espècie. A més, durant tot el procés no es van utilitzar tècniques de modificació genètica, per la qual cosa tampoc no estava subjecte a la legislació que regulava l'aprovació d'organismes modificats genèticament. La decisió final va ser utilitzar la legislació existent per regular *Wolbachia* com a producte químic veterinari (De Barro, 2011).

Un dels principals objectius del WMP era implicar la comunitat en el projecte i així, mitjançant la participació i el compromís de la població, aconseguir de manera escalada que es produïssin alliberaments de mosquits a tota la ciutat. Així, doncs, es va crear un model d'acceptació pública que se sustentava en diversos components, com ara: crear una campanya de sensibilització, realitzar enquestes telefòniques i presencials, disposar d'un sistema de gestió de problemes i resolució de dubtes, crear un grup de referència comunitària compost per les autoritats governamentals, el sector turístic i educatiu, etc.

Tot seguit, per establir al medi una colònia de mosquits infectats amb *Wolbachia* primer es van recollir ous de mosquits *Aedes aegypti* salvatges mitjançant trapes establertes al llarg de la ciutat de Townsville. A la Universitat de Monash i a la Universitat James Cook aquests ous es van dessecar i només s'amplificaven durant la fase d'encreuament i manteniment de la colònia salvatge. Durant tres generacions es van creuar la colònia salvatge de mosquits i una colònia de mosquits infectats amb la soca wMel. La nova colònia resultant, coneguda com a TSV wMel.f, es va mantenir fins a produir aproximadament 800.000 ous per setmana. Una vegada els ous feien eclosió, es traslladaven les larves a recipients de plàstic i durant els pròxims dies s'alimentaven amb menjar per a peixos d'aquari fins que passaven a l'estat de pupa. Finalment, un cop obtingudes el 60 % de les pupes, es transferien a les gàbies d'adults, que arribarien a contenir fins a 600 individus. Passats 4 dies alimentant les femelles adultes, es recollien els ous postos sobre les tires de cotó i es col·locaven en els contenidors humidificats, que s'enviaven al laboratori establert a Townsville.

Durant tot el procés, tant en una universitat com en l'altra, es van fer proves diagnòstiques de PCR a 80 mascles i 80 femelles de cada línia de cria per saber quina era la freqüència d'infecció de *Wolbachia*, la qual es va trobar per sobre del 97% en tots els casos.

L'àrea municipal de Townsville és de 190 km², però la superfície real sobre la qual es va portar a terme aquest projecte va ser de 66 km². Per abastar tant territori, l'alliberament dels mosquits in-

fectats amb *Wolbachia* va fer-se en 4 etapes. En la primera etapa es van utilitzar els recipients d'alliberament de mosquits que podem observar en la figura 4A. Aquests recipients són de plàstic blanc, tenen 4 orificis als costats i a l'interior hi trobem una tira de cotó amb 100 ous, menjar per a peixos d'aquari i 1 L d'aigua. El personal del programa va col·locar els recipients en zones exteriors amb ombra i de manera uniforme vora les propietats residencials de cada suburbi. Durant aquesta etapa, una mitjana de 88 mosquits es van alliberar de cada recipient i els alliberaments llançaments van continuar fins que la freqüència de *Wolbachia* en els mosquits capturats en aquesta zona va ser superior al 50% durant dues setmanes consecutives.

En les etapes 2-4 es van utilitzar estratègies perquè la comunitat participés en el programa, les quals es van centrar en les empreses locals i els domicilis. En aquest cas, es van utilitzar uns recipients especials alliberadors de mosquits coneguts com a Mozzie Box (figura 4C). Aquests recipients són els típics envasos de menjar per emportar, són més petits que els utilitzats en l'etapa 1 i tenen 4 forats a cada costat de l'envàs. A l'interior també hi podem trobar una tira de cotó amb 100 ous, menjar per a peixos d'aquari i, en aquest cas, 400 mL d'aigua. Més de 6.000 llars van participar en aquest projecte i realitzaven la gestió del seu propi contenidor. Així i tot, amb la Mozzie Box no es va assolir l'objectiu principal d'alliberar al medi un cert nombre de mosquits infectats amb *Wolbachia*, de manera que no es va tornar a utilitzar. En conseqüència, el WMP va reintroduir els recipients alliberadors de mosquits utilitzats en l'etapa 1 i, gràcies a activitats de participació comunitària, molts participants van acceptar allotjar a casa seva un dels recipients alliberadors de mosquits. En total, durant els 28 mesos que van durar les 4 etapes d'alliberament, es van alliberar aproximadament uns 4 milions de mosquits.



Figura 4. Recipients d'alliberament de mosquits. Font: *Scaled deployment of Wolbachia to protect the community from dengue and other Aedes transmitted arboviruses* (O'Neill, 2018)

També es va desenvolupar el Wolbachia Warriors Program, una que va permetre involucrar els nens i els centres escolars en l'alliberament de mosquits infectats amb *Wolbachia* al medi. Es va entregar a cada nen un recipient alliberador de mosquits com els usats durant la primera etapa, però en aquest cas el recipient era de plàstic transparent, per animar l'alumne a veure què passa a l'inte-

rior del contenidor (figura 4B). Com s'observa en la figura 4D, juntament amb aquest recipient també se'ls van entregar les instruccions, un calendari per fer el seguiment, un fulletó educatiu, etc.

D'ençà que es va començar el desplegament de mosquits de l'espècie *Aedes aegypti* infectats amb *Wolbachia* a Townsville el 2014, les notificacions de casos de dengue han continuat produint-se. De fet, del novembre del 2014 al juny del 2018 els casos diagnosticats han augmentat fins a 55, enfront dels 32 del període anterior. Ara bé, cal destacar que durant el període posterior a l'alliberament de mosquits infectats amb *Wolbachia* només 4 casos han estat adquirits localment, enfront dels 54 casos adquirits localment durant un període equivalent anterior a l'aplicació del WMP. Aquestes observacions, juntament amb la validació contínua de la deficient competència d'*Aedes aegypti* infectat amb *Wolbachia* wMel en àrees d'alliberament representen evidències epidemiològiques i empíriques coherents amb les projeccions de futur que té *Wolbachia* com a possible mesura per eliminar la transmissió del dengue.

El cost per portar a terme el programa per persona i km² pot variar entre els 16 \$ i els 29 \$, depenent de l'etapa d'alliberament dels mosquits. Tenint en compte la baixa densitat de població d'aquesta ciutat, se suposa que, a l'hora d'aplicar la mateixa metodologia a grans ciutats tropicals, amb una densitat poblacional més elevada, i com que els costos en recerca, seguiment i desplegament seran menors, el cost per persona pot arribar a ser d'1 \$ (O'Neill, 2018)

3.3.1.2. Aplicació a altres malalties víriques transmeses per vectors

Actualment el virus del Zika (família *Flaviviridae*) s'ha estès a tots els països on es transmet el dengue i, tenint en compte la similitud que hi ha entre aquests dos virus, es pot esperar que coexisteixin en les mateixes àrees geogràfiques i es transmetin pel mateix vector, *Aedes aegypti*. És per això que se suposa que *Wolbachia* també pot bloquejar la transmissió del virus del Zika, igual que com ho fa amb el virus del dengue. De fet, aquesta assumpció ha estat demostrada empíricament i s'ha observat en els laboratoris que el grau de bloqueig de *Wolbachia* pel virus del Zika és major que el del virus del dengue. Per tant, l'ús del WMP per bloquejar la transmissió del dengue també és útil per limitar la transmissió del Zika (O'Neill, 2018).

Igual que amb el virus del dengue i del Zika, *Wolbachia* ha demostrat que confereix protecció a *Aedes aegypti* enfront del virus del *chikungunya* (família *Alphavirus*) i fins a un cert punt enfront del virus de la febre groga (família *Flaviviridae*). Davant l'expansió d'aquests virus a l'hemisferi occidental i les evidències de *Wolbachia* per limitar la transmissió del dengue, s'han fet a Colòmbia alguns estudis en què s'ha demostrat que els mosquits infectats amb *Wolbachia* i amb el virus del *chikungunya* no tenen la capacitat infectiva de transmetre el virus i, consegüentment, provocar la malaltia. Aquests resultats han tingut un gran impacte en les estratègies de control vectorial, per la qual cosa hi ha la possibilitat que el mètode de control biològic amb *Wolbachia* es pugui utilitzar com a estratègia multivalent per a tots els arbovirus transmesos per *Aedes aegypti* (Aliota, 2016).

4. Discussió

En els últims anys s'ha incrementat la incidència del dengue i, a més, s'ha estès a noves àrees geogràfiques en forma de brots epidèmics de caràcter explosiu. Com que no hi ha un tractament i una vacuna efectius contra el virus del dengue, l'única estratègia disponible és limitar la competència vectorial i d'aquesta manera disminuir la transmissió de la malaltia. Actualment, el mètode de control biològic és una de les millors eines per aplicar amb èxit.

El World Mosquito Program s'encarrega de portar a terme aquesta idea alliberant al medi mosquits infectats amb *Wolbachia*. Primer es va començar fent petits estudis als laboratoris i actualment aquest projecte s'està aplicant a grans àrees geogràfiques d'arreu del món i s'estan obtenint uns resultats sorprenentment satisfactoris. No obstant això, perquè aquest projecte es desenvolupi cor-

rectament són necessaris diversos factors, entre els quals destaquem l'èxit en l'establiment i el manteniment de *Wolbachia* en la població adulta de mosquits salvatges i la participació i l'acceptació per part de la comunitat.

Passat un temps des dels primers alliberaments de mosquits al medi avalats per les entitats de salut governamentals, *Wolbachia* ha demostrat que és autosostenible, per la qual cosa es converteix en una mesura assequible i aplicable a llarg termini. A més, ha tingut resultats positius en moltes parts del món i la transmissió local del dengue no s'ha evidenciat en les zones on la freqüència d'infecció de *Wolbachia* és alta. Finalment, tenint en compte que és un mètode poc costós i segur per a les persones, els animals i el medi ambient, *Wolbachia* s'ha convertit en una eina amb gran projecció de futur.

Aedes aegypti és el vector majoritari que transmet el virus del dengue, però també té la capacitat de ser portador i de transmetre altres malalties arbovirals. Recentment s'ha estudiat quin és l'efecte de *Wolbachia* en els mosquits infectats amb el virus del Zika, el virus del *chikungunya* i el virus de la febre groga, i els resultats demostren que el bacteri també té la capacitat de limitar aquestes infeccions en el mosquit. Aquest fet ja no restringeix l'ús de *Wolbachia* com a eina de control biològic per a la malaltia del dengue, sinó que el seu ús i el seu potencial també es poden amplificar per reduir la propagació d'altres malalties transmeses per mosquits.

5. Conclusions

Les principals conclusions del treball es descriuen a continuació:

- El dengue és una malaltia infecciosa sistèmica causada pel virus del dengue i transmesa per la picada d'un mosquit. Depenent del quadre clínic, la infecció pot ser asimptomàtica o pot variar des d'una simptomatologia lleu fins a un cas greu potencialment mortal.
- El principal vector responsable de transmetre el dengue és el mosquit *Aedes aegypti*.
- El dengue afecta les regions tropicals i subtropicals del planeta i és endèmic en més de cent països.
- La malaltia del dengue s'ha estès a noves àrees, on ha causat brots epidèmics. De fet, el 2018 es va detectar per primer cop un cas de dengue autòcton a Catalunya.
- La falta d'un tractament i una vacuna efectius contra el virus del dengue comporta el desenvolupament de noves estratègies de control vectorial, entre les quals destaquem el control biològic.
- *Wolbachia* és un bacteri intracel·lular endosimbiòtic que es transmet verticalment i es troba en la majoria d'artròpodes i nematodes.
- Aquest bacteri endosimbiont actua produint alteracions reproductives en l'hoste i el mecanisme més comú és la incompatibilitat citoplasmàtica.
- *Aedes aegypti* ha estat infectat artificialment amb *Wolbachia*, el qual redueix la transmissió del dengue mitjançant dos mecanismes: disminuint el temps de vida de la població adulta de mosquits i reduint la replicació del virus del dengue en els mosquits infectats.
- El World Mosquito Program és l'encarregat de portar a terme els alliberaments de mosquits infectats amb *Wolbachia* al medi i s'ha demostrat que la freqüència d'infecció del bacteri en els mosquits salvatges es manté estable passats els anys.
- L'èxit d'aquest projecte en alliberaments a petita escala ha demostrat que el mètode del WMP és aplicable i factible a grans àrees geogràfiques de diversos països.
- Les dades obtingudes dels alliberaments realitzats pel World Mosquito Program a Austràlia, Indonèsia, Vietnam, el Brasil i Colòmbia indiquen que els casos de transmissió local de dengue han disminuït considerablement.
- El mètode de control biològic amb *Wolbachia* també pot bloquejar la transmissió d'altres arbovirus, com ara el virus del Zika, el del *chikungunya* i el de la febre groga.

6. Bibliografia

- ALIOTA, M., WALKER, E., URIBE YEPES, A., DARIO VELEZ, I., CHRISTENSEN, B., OSORIO, J. (2016) «The wMel Strain of *Wolbachia* Reduces Transmission of Chikungunya Virus in *Aedes aegypti*». *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 10(4), pp. e0004677.
- DE BARRO, P., MURPHY, B., JANSEN, C., MURRAY, J. (2011) «The proposed release of the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti* containing a naturally occurring strain of *Wolbachia pipientis*, a question of regulatory responsibility». *Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit*, 6(S1), pp. 33-40.
- BHATT, S., GETHING, P., BRADY, O., MESSINA, J., FARLOW, A., MOYES, C., DRAKE, J., BROWNSTEIN, J., HOEN, A., SANKOH, O., MYERS, M., GEORGE, D., JAENISCH, T., WINT, G., SIMMONS, C., SCOTT, T., FARRAR, J., HAY, S. (2013) «The global distribution and burden of dengue». *Nature*, 496(7446), pp. 504-507.
- BIAN, G., XU, Y., LU, P., XIE, Y., XI, Z. (2010) «The endosymbiotic bacterium *Wolbachia* induces resistance to dengue virus in *Aedes aegypti*». *PLoS Pathogens*, 6(4), pp. e1000833.
- CLYDE, K., KYLE, J., HARRIS, E. (2006) «Recent advances in deciphering viral and host determinants of dengue virus replication and pathogenesis». *Journal of Virology*, 80(23), pp. 11418-11431.
- Comparison dengue vectors (2012). Disponible a: www.cdc.gov/dengue/resources/30jan2012/comparison-denguevectors.pdf (accedit: 16 abril 2019).
- DORIGATTI, I., MCCORMACK, G., NEDJATI-GILANI, G., FERGUSON, N. (2018) «Using *Wolbachia* for Dengue Control: Insights from Modelling». *Trends in Parasitology*, 34(2), pp. 102-113.
- FERGUSON, N., KIEN, D., CLAPHAM, H., AGUAS, R., TRUNG, V., BICH CHAU, T., POPOVICI, J., RYAN, P., O'NEILL, S., MCGRAW, E., LONG, V., DUI, L., NGUYEN, H., VINH CHAU, N., WILLS, B., SIMMONS, C. (2015) «Modeling the impact on virus transmission of *Wolbachia*-mediated blocking of dengue virus infection of *Aedes aegypti*». *Science Translational Medicine*, 7(279), pp. 279ra37.
- GARRITY, G.M. et al. (1923) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Vol. 2, part C. New York, Springer, (ed. 2001).
- Generalitat de Catalunya (2018) *Primer cas de dengue autòcton a Catalunya*. Disponible a: <https://web.gencat.cat/ca/actualitat/detall/Primer-cas-de-dengue-autocton-a-Catalunya-00001> (accedit: 9 abril 2019).
- GUZMAN, M., HALSTEAD, S., ARTSOB, H., BUCHY, P., FARRAR, J., GUBLER, D., HUNSPERGER, E., KROEGER, A., MARGOLIS, H., MARTÍNEZ, E., NATHAN, M., PELEGRINO, J., SIMMONS, C., YOKSAN, S., PEELING, R. (2010) «Dengue: a continuing global threat». *Nature Reviews. Microbiology*, 8(12 Suppl.), pp. S7-16.
- GUZMAN, M., KOURÍ, G. (2004) «Dengue diagnosis, advances and challenges». *International Journal of Infectious Diseases IJID: Official Publication of the International Society for Infectious Diseases*, 8(2), pp. 69-80.
- HILGENBOECKER, K., HAMMERSTEIN, P., SCHLATTMANN, P., TELSCHOW A., WERREN, J. (2008) «How many species are infected with *Wolbachia*? A statistical analysis of current data». *FEMS Microbiology Letters*, 281(2), pp. 215-220.
- JOUBERT, D., WALKER, T., CARRINGTON, L., DE BRUYNE, J., KIEN, D., HOANG, N., CHAU, N., ITURBE-ORMAETXE, I., SIMMONS, C., O'NEILL, S. (2016) «Establishment of a *Wolbachia* Superinfection in *Aedes aegypti* Mosquitoes as a Potential Approach for Future Resistance Management». *PLoS Pathogens*, 12(2), pp. e1005434.
- KYLE, J., HARRIS, E. (2008) «Global Spread and Persistence of Dengue». *Annual Review of Microbiology*, 62(1), pp. 71-92.
- LO, N., PARASKEVOPOULOS, C., BOURTZIS, K., O'NEILL, S., WERREN, J., BORDENSTEIN, S., BANDI, C. (2007) «Taxonomic status of the intracellular bacterium *Wolbachia pipientis*». *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57(3), pp. 654-657.
- MESSINA, J., BRADY, O., SCOTT, T., ZOU, C., PIGOTT, D., DUDA, K., BHATT, S., KATZELNICK, L., HOWES, R., BATTLE, K., SIMMONS, C., HAY, S. (2014) «Global spread of dengue virus types: mapping the 70 year history». *Trends in Microbiology*, 22(3), pp. 138-146.
- MUKHOPADHYAY, S., KUHN, R., ROSSMANN, M. (2005) «A structural perspective of the flavivirus life cycle». *Nature Reviews Microbiology*, 3(1), pp. 13-22.

- MURRAY, J., JANSEN, C., DE BARRO, P. (2016) «Risk Associated with the Release of *Wolbachia*-Infected *Aedes aegypti* Mosquitoes into the Environment in an Effort to Control Dengue». *Frontiers in Public Health*, 4, pp. 43.
- MURRAY, P.R., ROSENTHAL, K.S., PFALLER, M.A. (1990) *Microbiología médica*. Barcelona, Elsevier, (ed. 2017).
- O'NEILL, S., RYAN, P., TURLEY, A., WILSON, G., RETZKI, K., ITURBE-ORMAETXE, I., DONG, Y., KENNY, N., PATON, C., RITCHIE, S., BROWN-KENYON, J., STANFORD, D., WITTMEIER, N., ANDERS, K., SIMMONS, C. (2018) «Scaled deployment of *Wolbachia* to protect the community from dengue and other *Aedes* transmitted arboviruses». *Gates Open Research*, 2, pp. 36.
- O'NEILL, S. (2018) «The Use of *Wolbachia* by the World Mosquito Program to Interrupt Transmission of *Aedes aegypti* Transmitted Viruses. In: Hilgenfeld R., Vasudevan S. (eds) *Dengue and Zika: Control and Antiviral Treatment Strategies*. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, vol 1062. Springer, Singapore.
- OMS (2017) *El mosquito*. Ginebra, Organización Mundial de la Salud. Disponible a: www.who.int/dengue-control/mosquito/es/ (accedit: 16 abril 2019).
- OMS (2018a) *Dengue y dengue grave*. Ginebra, Organización Mundial de la Salud. Disponible a: www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/dengue-and-severe-dengue (accedit: 16 abril 2019).
- OMS (2018b) *Recomendación SAGE revisada sobre el uso de la vacuna contra el dengue*. Ginebra. Organización Mundial de la Salud. Disponible a: www.who.int/immunization/diseases/dengue/revised_SAGE_recommendations_dengue_vaccines_apr2018/en/ (accedit: 21 maig 2019).
- OMS i TDR (2009) *Dengue: Guías para el diagnóstico, tratamiento, prevención y control*. La Paz , Organización Mundial de la Salud.
- OPS i OMS (2015) *Dengue: guías para la atención de enfermos en la región de las Américas*. Washington DC, Organización Panamericana de la Salud.
- SCHULTZ, M., CONNOR, J., FRYDMAN, H. (2018) «Group B *Wolbachia* Strain-Dependent Inhibition of Arboviruses». *DNA and Cell Biology*, 37(1), pp. 2-6.
- SIMMONS, C., FARRAR, J., VAN VINH CHAU, N., WILLS, B. (2012) «Dengue». *New England Journal of Medicine*, 366(15), pp. 1423-1432.
- TIMMER, J. (2011) «Meet *Wolbachia*: The Male-Killing, Gender-Bending, Gonad-Eating Bacteria». *Science*, pp. 990-992.
- TORTORA, G. J., FUNKE, B. R., CASE, C. L. (1993) *Introducción a la microbiología*. Buenos Aires, Editorial Médica Panamericana (ed. 2017).
- WERREN, J. (1997) «Biology of *Wolbachia*». *Annual Review of Entomology*, 42, pp. 587-609.
- WERREN, J., BALDO, L., CLARK, M. (2008) «*Wolbachia*: master manipulators of invertebrate biology». *Nature Reviews. Microbiology*, 6, pp. 741-751.
- YEAP, H., MEE, P., WALKER, T., WEEKS, A., O'NEILL, S., JOHNSON, P., RITCHIE, S., RICHARDSON, K., DOIG, C.: ENDERSBY, N., HOFFMANN, A. (2011) «Dynamics of the "Popcorn" *Wolbachia* infection in outbred *Aedes aegypti* informs prospects for mosquito vector control». *Genetics*, 187(2), pp. 583.
- ZHANG, G., HUSSAIN, M., O'NEILL, S., ASGARI, S. (2013) «*Wolbachia* uses a host microRNA to regulate transcripts of a methyltransferase, contributing to dengue virus inhibition in *Aedes aegypti*». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(25), pp. 10276-10281.
- ZUG, R., HAMMERSTEIN, P. (2012) «Still a host of hosts for *Wolbachia*: analysis of recent data suggests that 40% of terrestrial arthropod species are infected». *PloS One*, 7(6), pp. e38544.