
Susceptibilidad de *Anopheles nuneztovari* Gabaldón y *Aedes aegypti* L a la infección con *Romanomermis iyengari* Welch (*Rhabditida: Mermitidae*).

Janeth E. Rojas-Urdaneta¹, Mayira Sojo-Milano², Milena Mazzarri-Pelossa²,
Lázaro A. Soca D³ e Ysrael García-Avila⁴.

¹Centro de Investigaciones en Enfermedades Tropicales (CIET) "Dr. Witremundo Torrealba", Universidad de Carabobo. ²Servicio de Endemias Rurales del Estado Aragua, Ministerio de Salud y Desarrollo Social (MSDS). ³Unidad de Genética Médica, Universidad del Zulia, Maracaibo, Venezuela y ⁴Departamento de Control de Vectores, Instituto de Medicina Tropical Pedro Kourí (IPK) La Habana, Cuba.
Correo electrónico: rujaneth@yahoo.com

Palabras clave: Control biológico, nemátodos, parasitismo, vectores, *Culicidae*, *Anophellinae*.

Resumen. Con la finalidad de valorar la capacidad de infestación del nemátodo parásito de mosquitos, *Romanomermis iyengari* Welch, sobre larvas de las especies *Anopheles nuneztovari* Gabaldón y *Aedes aegypti* L₁, se condujo un estudio en condiciones de laboratorio. Para cada especie se tomaron 900 larvas de los estadios L₁ al L₃. Éstos se infestaron con larvas preparásiticas de *R. iyengari* en proporciones de 5:1 y 10:1. Se obtuvieron promedios de infestación de 3,9 y 6,7 para *Anopheles nuneztovari* y de 1,9 y 4,7 para *Aedes aegypti* respectivamente. Los niveles de mortalidad oscilaron entre 95 y 100% para ambas especies, observándose mayor susceptibilidad al parasitismo en las larvas de *Anopheles nuneztovari*.

Susceptibility to the infestation of *Anopheles nuneztovari* Gabaldón and *Aedes aegypti* L with *Romanomermis iyengari* Welch (*Rhabditida: Mermitidae*).

Invest Clin 2002; 43(4): 255-262.

Key words: Biological control, nematode, parasitism, vectors, *Culicidae*, *Anophellinae*.

Abstract. A laboratory-based study was performed in order to assess the infestation capacity of the mosquito parasite nematode *Romanomermis iyengari* Welch, on *Anopheles nuneztovari* Gabaldón and *Aedes aegypti* L. For each mosquito species, nine hundred (900) I to III instars larvae were taken. These

larvae were infested with pre-parasitic larvae of *R. iyengari* in proportions of 5:1 and 10:1. The infestation averages obtained were 3,9 and 6,7 for *Anopheles nunestovari*, and 1,9 and 4,7 for *Aedes aegypti* respectively. Mortality ranked between 95 and 100% for both mosquito species and *Anopheles nunestovari* showed the highest susceptibility to the nematode parasitism.

Recibido: 30-07-2001. Aceptado: 18-09-2002.

INTRODUCCIÓN

La lucha antivectorial basada en el uso de insecticidas químicos, en la mayoría de los casos, ha sido la herramienta más poderosa y de uso más extendido para controlar las enfermedades transmitidas por vectores, las cuales representan una de las mayores causas de mortalidad en los países en desarrollo (1, 2). La aplicación sistemática e indiscriminada de estos plaguicidas ha traído como consecuencia la aparición, propagación e incremento constante de la resistencia, así como la destrucción de la fauna benéfica (enemigos naturales), todo lo cual ha contribuido al resurgimiento de plagas (3). A estos fenómenos se suman los innumerables reportes sobre la presencia de residuos tóxicos en productos alimenticios, lo cual ha elevado los costos de los programas de control (4-7). Esta situación ha ocasionado que la popularidad de los métodos químicos decaiga y se promuevan soluciones alternativas a través del empleo de agentes de control biológico (8-10), estrategia que crece rápidamente como alternativa en la lucha contra los vectores de enfermedades como un elemento de importancia en el enfoque del manejo integral de las más importantes enfermedades metaxénicas (11-13).

Entre los numerosos agentes biológicos que se han probado como larvicidas, los nemátodos mermítidos, han sido considerados de alto potencial para el control de vectores (11, 12), demostrando poseer una buena capacidad patogénica, ser específicos e inocuos para otros hidrobiontes, y ser reciclables en el medio ambiente (13-16).

La especie *Romanomermis iyengari* Welch, es un nemátodo mermítido, endoparásito obligado de larvas de mosquito, cuyo estado infestivo preparásito es de corta vida, debiendo encontrar un hospedero dentro de las 36 a 48 horas después de la eclosión del huevo. Este nemátodo se desarrolla en el interior de la larva, la cual muere cuando el parásito ya adulto emerge a través de la cutícula del mismo, seguido de la hemolinfa. *R. iyengari* fue originalmente encontrado en una amplia variedad de especies de larvas de mosquitos de los géneros *Anopheles* y *Culex* y fue aislado en su forma parásita en larvas de *Anopheles subpictus* Grassi en Bangalore India (17). Welch (17) encontró que en condiciones de laboratorio este nemátodo mudaba, se apareaba y depositaba sus huevos en arena húmeda, los cuales eclosionaban cuando se inundaban con agua, liberando las etapas infestivas en forma de preparásitos, tal y como ocurre su ciclo vital en la naturaleza.

La capacidad infestiva de este nemátodo se ha observado en condiciones de laboratorio y campo en diversas especies de mosquitos de los géneros *Culex* y *Anopheles*. En varios países de Asia y de América, ha sido demostrada la efectividad de los nemátodos al reducir la densidad de estos géneros de mosquitos, así como la prevalencia malarica, utilizando el mermítido *Romanomermis culicivora* Ross & Smith y *R. iyengari*, (9, 15, 18-22). En Venezuela no ha sido evaluada esta alternativa de control, aún cuando ya varios países como EEUU, Brasil, México y Cuba, entre otros, incluyen en su arsenal para el control vectorial, bio-

plantas de producción de nemátodos parásitos de mosquitos de las especies: *R. culicivora* y *R. iyengari*, entre otras, con demostrada efectividad en el control vectorial (9, 15, 18). En este sentido, el presente estudio, fue realizado con la finalidad de determinar las posibilidades del *R. iyengari* como agente de control biológico, comprobando su capacidad infestiva en larvas de las especies *Anopheles nuneztovari* y *Aedes aegypti*, vectores de gran importancia como transmisores de las enfermedades de Malaria y Dengue en Venezuela.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para determinar la capacidad infestiva del *R. iyengari*, se tomó primeramente un cultivo del nemátodo (Donación del Instituto de Medicina Tropical Pedro Kourí de Cuba), al cual se le agregó agua destilada (500 mL) para inducir la eclosión de las formas larvarias infestivas (larvas parasitarias). Transcurridas 5 horas, se tomó esta solución contentiva de larvas parasitarias en un cilindro graduado de 1000 mL, tomando 10 mL de la misma a la cual se le agregó 90 mL de agua, con la finalidad de diluir la muestra original y facilitar el conteo de los preparásitos. Se mezcló suavemente la solución para homogeneizar y luego, mediante el método de dilución volumétrica (23) que consistió en tomar 1 mL de la muestra final (100 mL) y distribuir la cantidad de 0,1 mL (10 alícuotas) en cada uno de diez pozos de una placa de microtitulación, ésta se llevó al microscopio para su conteo. El total de nemátodos contabilizados por cada pozo se sumaron y por regla de tres simple se calculó el contenido de la solución madre y se realizaron los cálculos de las dosis a experimentar, determinando el número de parasitos necesarios para la infestación de las larvas de *An. nuneztovari* y de *Ae. aegypti*.

Las larvas de *An. nuneztovari* y de *Ae. aegypti* se obtuvieron de criaderos naturales en campo y en depósitos de aguas domésticos, respectivamente. Estas larvas fueron trasladadas al laboratorio en envases plásticos de boca ancha de 25/9,5 cm y colocadas en bandejas de plástico en el laboratorio de 1600 mL de capacidad. Se realizaron 3 réplicas con 100 larvas cada una y un testigo por especie, estadio y por cada dosis a evaluar (5:1, 10:1, es decir: 5 y 10 parasitos por larva de mosquito). El testigo se preparó en iguales condiciones (con 100 larvas c/u) pero sin infestar con el nemátodo. Las larvas fueron alimentadas con una combinación a partes iguales de alimento para peces y levadura (50%-50%). Transcurridos 3 días después de la aplicación de la dosis respectiva de infestación, se procedió a la disección del 30% de la muestra de cada bandeja, usando para ello agujas entomológicas a través de un microscopio estereoscópico, binocular (22). No se utilizaron larvas de mosquitos L₄, ya que el objetivo del estudio fue determinar la capacidad de infestación del nemátodo sobre larvas de estos mosquitos, valoradas a los tres días posttratamiento y las larvas de este estadio pasan rápidamente al estado de pupa, lo cual permitiría determinar su efecto sobre la pupación y/o la eclosión de la fase adulta del mosquito, siendo esto objeto de otra investigación al respecto.

Se efectuaron las observaciones y se contabilizó el nivel de infestación, calculándose la media y el porcentaje de mortalidad larval alcanzado. Los datos obtenidos fueron procesados estadísticamente, para lo cual se determinó la distribución normal de todas las medias muestrales, y se calculó además la medida cuadrática de todas las desviaciones de cada valor con respecto a su media, para la varianza, utilizando la prueba de comparación de medias muestrales, para la homogeneidad de varianza. Para la comparación de medias de infestación se aplicó

un ANOVA y una prueba Duncan con un nivel de significación de $p < 0,05$.

RESULTADOS

A partir de los experimentos realizados se pudieron observar los niveles de parasitismo con respecto a las medias de infestación obtenidas en los diferentes estadios larvales evaluados de las especies *An. nuneztovari* y *Ae. aegypti*. Con dosis de 5:1, *An. nuneztovari* obtuvo unas medias de infestación de: 4,8; 4 y 3, para los estadios I, II y III, respectivamente. *Ae. aegypti* obtuvo medias de: 2,6; 1,9 y 1,4 para los mismos estadios respectivamente (Tabla I). Con la dosis

de 10:1 *An. nuneztovari* obtuvo una media de infestación de: 7,5; 7,2 y 5,3 en los tres estadios evaluados y *Ae. aegypti* obtuvo una media de: 5,6; 4,5 y 4,0 respectivamente en los tres estadios (Tabla II), la distribución de las medias del muestreo aleatorio llevado a cabo, siguen una curva normal ($Z \sim N(0,1)$) en un 96,56%. Los porcentajes de mortalidad con ambas dosis oscilaron entre 98 y 100% para *An. nuneztovari* y entre 95 y 100% para *Ae. aegypti*. Los controles permanecieron vivos durante todos los ensayos efectuados, alcanzando solo el 2% de mortalidad larval.

Los niveles más altos de parasitismo se observaron en larvas de *An. nuneztovari*

TABLA I
MEDIA DE INFESTACIÓN POR EL NEMÁTODO *Romanomermis iyengari* CON DOSIS DE 5:1
EN LARVAS DE *An. nuneztovari* Y *Ae. aegypti* (DOSIS = 5:1)

Especie	Estadio larval	Media de Infestación*	Mortalidad Larval (%)	Control Mortalidad (%)
<i>An. nuneztovari</i>	I	4,8	100	0
<i>An. nuneztovari</i>	II	4,0	100	0
<i>An. nuneztovari</i>	III	3,1	98	0
<i>Ae. aegypti</i>	I	2,6	98	1
<i>Ae. aegypti</i>	II	1,9	98	0
<i>Ae. aegypti</i>	III	1,4	95	0

* Diferencias significativas entre medias de infestación de las especies ($F = 464,2$; $p < 0,001$).

TABLA II
MEDIA DE INFESTACIÓN POR EL NEMÁTODO *Romanomermis iyengari* CON DOSIS DE 10:1
EN LARVAS DE *An. nuneztovari* Y *Ae. aegypti* (DOSIS = 5:1)

Especie	Estadio larval	Media de Infestación*	Mortalidad Larval (%)	Control Mortalidad (%)
<i>An. nuneztovari</i>	I	7,5	100	1
<i>An. nuneztovari</i>	II	7,2	100	1
<i>An. nuneztovari</i>	III	5,3	98	0
<i>Ae. aegypti</i>	I	5,6	100	0
<i>Ae. aegypti</i>	II	4,5	98	2
<i>Ae. aegypti</i>	III	4,0	95	1

* Diferencias significativas entre medias de infestación de las especies ($F = 464,2$; $p < 0,001$).

para ambas dosis, en todos los estadios ensayados.

La comparación mediante ANOVA de las medias de infestación entre ambas especies, arrojó diferencias significativas ($F=464,2$; $p < 0,001$), encontrándose que *An. nuneztovari* presenta mayor susceptibilidad al parasitismo por el nemátodo ($p < 0,005$). Se observó además que los estadios I y II en ambas especies estudiadas, resultaron ser mayormente infectados, presentando el estadio III una menor susceptibilidad al parasitismo del mermítido, aunque éstos resultaron infectados.

Los resultados obtenidos mostraron además un incremento en los niveles de parasitismo en relación con el aumento de la dosis (10:1) en todos los estadios larvales de ambas especies. Mediante un análisis de ANOVA se pudo observar que tanto la dosis como el estadio larval, afectaron los resultados de los valores medios de infestación ($p < 0,001$). La prueba Duncan reveló que las respuestas a las diferentes dosis ensayadas fueron significativamente diferentes ($p < 0,005$), al igual que las medias de infestación halladas en los tres estadios larvales de las dos especies de mosquitos. Por otra parte con la dosis de 10:1 se obtuvo un super-parasitismo en larvas, que produjo la muerte prematura de las mismas en un 45% después de 24 horas de exposición al nemátodo, con la consiguiente muerte de éste al no lograr su desarrollo dentro de la larva hospedadora.

DISCUSIÓN

El porcentaje de mortalidad y el parasitismo alcanzado por *R. iyengari* sobre larvas de *An. nuneztovari* y *Ae. aegypti* evidencian que esta especie de nemátodo ofrece altas posibilidades para ser utilizado como agente de control de larvas para ambas especies.

Los niveles de infestación alcanzados por *An. nuneztovari* coinciden con lo repor-

tado por Petersen y Willis (24), Santamarina y col (13) Santamarina y Bellini (25); quienes refieren que las larvas de este género, principalmente en los primeros estadios poseen una alta susceptibilidad al ataque de los estados de vida libre del mermítido. Probablemente esto se deba a que como las larvas de anofelinos se alimentan y respiran en la superficie del agua y por su parte el nemátodo en su fase preparasítica infestiva, permanece en la superficie del agua (conducta tigmotáctica) en busca de una larva hospedera para completar su ciclo vital, de tal modo que la posibilidad de contacto se hace mayor con larvas de este género. En contraste, los resultados que aquí se presentan, describen una disminución de las medias de infestación de larvas de *Ae. aegypti*, lo cual es atribuible al hecho de que dichas larvas adoptan una posición perpendicular al plano superficial del agua para respirar y se alimenta en toda la columna de agua, ascendiendo y descendiendo, disminuyendo así la posibilidad de contacto con el mermítido.

En cuanto a las dosis ensayadas se encontró que la proporción 5:1 fue eficaz para provocar la infestación de ambas especies de mosquitos, logrando entre un 95 a 100% de mortalidad larval. Con la dosis de 10:1, se observó un súper-parasitismo en las larvas de los tres estadios estudiados de ambas especies, especialmente en L_1 y L_2 , esto ocurrió a las 24 horas de observación, en varias de las réplicas de los diferentes estadios ensayados, el resto de las larvas expuestas siguieron vivas hasta el tercer día de observación, tiempo en el cual se valoró la infestación mediante la disección del 30% de la muestra. Las larvas vivas infestadas completaron luego el 98 a 100% de mortalidad antes de llegar a la etapa de pupa y/o adultos. Esta situación es importante tenerla en cuenta ya que esto implica que el parásito no pueda desarrollarse debido a la muerte temprana de las larvas hospedadoras, lo que

limitaría la posibilidad de permanencia del nemátodo en el medio natural, al no poder completar su ciclo vital. Para el reciclaje del nemátodo en criaderos naturales, sería imprescindible entonces el cálculo adecuado de las dosis de aplicación de acuerdo a la evaluación previa que se haga de cada criadero a tratar, en especial la medición de la cantidad de larvas de mosquitos existentes por m² en el criadero para que estas larvas de mosquito infestadas permanezcan el tiempo normal de sobrevivencia para el completo desarrollo del nemátodo que garantice la permanencia del ciclo vital de éste en el medio, para un control permanente de los criaderos tratados. Estas observaciones coinciden con las realizadas por Ambros y Santamarina (26), por Santamarina y col (13) y por Santamarina y Bellini (25), para *R. culicivora* y para *R. iyengari*, por lo que estos autores recomiendan ajustar las dosis del biolarvicida para garantizar el reciclaje del nemátodo en los criaderos tratados.

Aunque el parasitismo ocurrió en las dos especies en todos los estadios evaluados, se pudo observar que el mayor parasitismo tuvo lugar en los estadios más jóvenes L₁ y L₂ concordando con las observaciones realizadas por Petersen y Willis (27) en larvas de *Anopheles albimanus* y de *Culex* sp. Esto probablemente se explique debido a que en estos estadios las larvas de mosquito presentan muy poco desarrollo orgánico con escasa formación de quitina en la pared cuticular, lo que la hace más suave, facilitando la entrada del estilete de los pre-parásitos del nemátodo (27), a diferencia del estadio L₃ el cual posee un mayor grosor de la pared, dificultando la entrada de los nemátodos. Los mosquitos que emergieron después de la infestación, estuvieron vivos por un máximo de 3 días, y al ser disecados mostraron el nemátodo vivo en su interior, por lo cual como el presente es un trabajo preliminar, sería importante continuar los estudios sobre la acción de este parásito en

las etapas finales del ciclo vital de estos mosquitos, así como también en nuestras condiciones naturales de campo. Por otro lado es recomendable aprovechar las implicaciones de sus características como alternativas que refuercen las estrategias de control integrado, considerando las posibilidades que presenta este nemátodo para su producción local de forma masiva en condiciones de laboratorio. El uso de éste como método biológico para el control de vectores posee beneficios de enorme importancia práctica, tanto en lo social como en lo económico. En el primer caso, por la influencia directa en el bienestar y la salud de la población; en el segundo, porque posibilitaría la disminución en los costos de los programas de control vectorial llevados a cabo en el país, los cuales muchas veces no resuelven el problema, agravando la contaminación ambiental existente, con el consiguiente deterioro de los ecosistemas, además de acentuar los problemas de resistencia vectorial.

AGRADECIMIENTOS

Al Instituto de Medicina Tropical "Dr. Pedro Kourí" (IPK) de La Habana Cuba, por su apoyo en este estudio al donarnos un cultivo de nemátodos parásitos de *Romanomermis iyengari* para poder realizar esta investigación. Al Dr. Alberto Santamarina Mijares del IPK, por su valiosa enseñanza sobre el manejo de nemátodos parásitos de larvas de mosquitos.

REFERENCIAS

1. **Tropical Diseases Research** (TDR news). Published by the UNDP/WORLD BANK/WHO Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases 1999; 58: 1-12.
2. **Phillips RS**. Current status of malaria and potencial for control. Clin Microbiol Rev 2001; 14(1):208-226.

3. **Patz JA, Gaczuk TK, Sellar N, Vittor AY.** Effects of environmental change on emerging parasitic diseases. *Int J Parasitol* 2000; 1:30(12-13):1395-1405.
4. **Georghio G, Lagunes AT.** The occurrence of resistance to pesticide in arthropod. FAO Rome 1991; p 300-318.
5. **World Health Organization.** Vector resistance to pesticides. WHO Technical Reports Series N° 818 Geneva; 1992^a, p 80-95.
6. **World Health Organization.** Tropical Disease Research Progress 1991-1992 WHO/TDR Geneva; 1993, p 55-77.
7. **Walker K.** Cort-comparison of DDT and alternative insecticides for malaria control. *Med Vet Entomol* 2000; 71(4): 54-345.
8. **World Health Organization.** Guide to field determination of major groups of pathogens affecting vectors of human diseases. WHO/TDR 82.860, Geneva; 1982, p 28-39.
9. **World Health Organization.** Tropical disease research. A global partnership WHO/TDR Geneva; 1987 p 20-24.
10. **Badii MH.** El concepto de control integrado. *Unach* 1996; 2:35-37.
11. **Prat N, Toja J, Sola C, Burgos D, Plans M, Rieradevall M.** Effect of dumping and activities on the aquatic ecosystems of the Guardiana River following a toxic flood. *Sci Total Environ* 1999; 6; 242(1-3):48-231.
12. **Baker R, Muller R.** *Advances in Parasitology*. 2nd Ed. London: Academic Press; 1985, p 289-300.
13. **Santamarina MA, Perez PR, Martinez SH.** Susceptibilidad de *Aedes aegypti* al parasitismo por *Romanomermis culicivora* en condiciones de laboratorio y campo en Oaxaca México. *Rev Panam de Salud Pública* 2000; 8(5):299-304.
14. **Poinar, GO, Otieno WA.** Evidence of four molts in the Mermithidae. *Nematológica* 1974; 20: 370.
15. **Rojas W, Northup J, Gallo O, Montoya A, Montoya F, Restrepo M.** Reduction of malaria prevalence after introduction of *Romanomermis culicivora* (Mermithidae: Nematoda) in Anopheles larval habitats in Colombia. *Bull World Health Organ.* 1987; 65(3):331-337.
16. **Paily KB, Balabarma K.** Susceptibility of the species of mosquito larvae to the parasitic nematode *Romanomermis iyengari* and its development. *Med Vet Entomol* 2000; 14(4):426-429.
17. **Welch H.** *Romanomermis iyengari* species nov. Nematode: Mermithidae Braun 1883. *Pilot Register of Zoology* 1964; 4: 200-209.
18. **Chandahas RK, Rajagopalan PK.** Mosquito breeding and the natural parasitism of larvae by a fungus *Coelomomyces* and a mermithid nematode *Romanomermis*, in paddy fields in Pondicherry. *Indian J Med Res* 1979; 69: 63-70.
19. **Santamarina MA, García GI, Raúl G.** Valoración de la capacidad infestiva del nematodo parásito *Romanomermis iyengari* (Nematoda:Mermithidae) en criaderos naturales de larvas de mosquitos. *Rev Cub Med Trop* 1993; 45:128-131.
20. **Prindaseva EA, Lebedeca NI, Sheherban ZP, Kadyrova MK.** An evaluation of the possibility of using *Romanomermis iyengari* Welch, 1964 mermithids for mosquito control in Uzbekistan. *Med Parasitol (Mosk)* 1990; 1:15-17.
21. **Vladimirova VV, Prindatseva EA, Gafurov AK, Muatova ME.** A trial of *Romanomermis iyengari* and *R. culicivora* mermithids as a means for controlling blood-sucking mosquitoes in the Tadzhik SSR. *Med Parazitol (Mosk)* 1990; 3:42-45.
22. **Ross JF, Smith SM.** A review of the mermithid parasites (Nematode: Mermithid) described from North America mosquitoes (Diptera Culicidae) with description of three new species. *Can J Zool* 1976; 54: 1084-1110.
23. **Petersen JJ, Willis OR.** Procedures of the mass rearing of a mermithid parasite of mosquitoes. *Mosq News* 1972; 2(32): 226-230.
24. **Petersen JJ y Willis OR.** Experimental release of a mermithid nematode to control *Anopheles* mosquitoes in Louisiana. *Mosq News* 1974; 34:316-319.
25. **Santamarina MA y Bellini AC.** Mass production of *Romanomermis iyengari* (Nematoda: Mermithidae) applied to anopheline breeding sites in Boa Vista (Roraima) Bra-

-
- zil. Rev Panam Salud Publica 2000; 7(3):155-61.
26. **Ambros GC, Santamarina MA.** Fecundidad y desarrollo embrionario de *Romanermis culicivora*. Rev Cubana Med Trop 1994; 46(3):159-163.
27. **Petersen JJ y Willis OR.** Establishment and recycling of a mermithid nematode for the control of larval mosquitoes. Mosq News 1975; 35:526-532.