

INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL "PEDRO KOURÍ"

## Efecto patogénico del nematodo parásito *Romanomermis iyengari* (Nematoda: Mermithidae) en larvas del mosquito *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) en condiciones de laboratorio en el Estado de Oaxaca, México

Dr. Albero Santamarina Mijares<sup>1</sup> y M.C. Rafael Pérez Pacheco<sup>2</sup>

### RESUMEN

Se realizaron pruebas de laboratorio con aguas procedentes de criaderos de *Aedes aegypti* Linnaeus (1762), para determinar el efecto patogénico del nematodo parásito *Romanomermis iyengari* Welch 1964, en larvas de mosquito de esta especie. De acuerdo con los resultados observados, la aplicación de una dosis de 10:1 (10 preparásitos por larva de mosquito) arrojó niveles de parasitismo del orden de 90, 93, 91 y 85 % en larvas de mosquito de I, II, III y IV estadio, respectivamente. Con la dosis más elevada de 20:1 (20 preparásitos por larva de mosquito) se obtuvieron niveles de parasitismo con valores de 98, 97, 93 y 89 % en larvas de I, II, III y IV estadio respectivamente. En general, los valores de los parámetros físico-químicos como pH, conductividad, oxígeno y cloruros calculados en estas aguas en las cuales se realizaron los ensayos de laboratorio no afectaron aparentemente la capacidad infectiva de los preparásitos de *R. iyengari*.

**Descriptor DeCS:** NEMATODA/patogenicidad; LARVA/parasitología; AEDES/parasitología; CONTROL DE MOSQUITO; LABORATORIO; MÉXICO.

*Romanomermis iyengari*, Welch 1964, es un nematodo mermitido que fue originalmente colectado en arrozales en el área de Pondicherry, India, como parásito de larvas de *Anopheles vagus* Doenitz, *Anopheles subpictus* Grassi, *Anopheles barbirostris* Vander Wulp, *Culex* del grupo vishnui, *Culex tritaeniorhynchus* Gile y *Culex* (*Lutzia*) *sp.* El estado parasítico de crecimiento completo emergió de larvas en IV estadio de desarrollo (nematodo posparásito), atravesó la cutícula y resultó finalmente con la muerte de las larvas hospederas. Se observó que la tasa de parasitismo era generalmente alta, aunque variaba de acuerdo con la estación del año.

Observaciones de laboratorio evidenciaron que el nematodo *R. iyengari* mudaba, se apareaba y depositaba sus huevos en la arena húmeda. Cuando ésta se inundaba con agua, los huevos se rompían y se liberaban las etapas infectivas (nematodos preparásitos). En vistas del espesor particular de la cáscara del huevo (8  $\mu$ ) y de su cutícula adulta, *R. iyengari* podría ser más capaz de sobrevivir los períodos de desecación que *Romanomermis culicivora* Ross y Smith 1976.<sup>1,2</sup> Otros autores<sup>3,4</sup> han demostrado que los preparásitos de *R. iyengari* no pueden sobrevivir a un pH y salinidad mayores de 7,5 y 0,025 M (1,46 g/L), respectivamente, y los es-

<sup>1</sup> Doctor en Ciencias Biológicas. Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí".

<sup>2</sup> Master en Ciencias. Instituto Politécnico de Oaxaca, México.

tados adultos no pudieran perpetuarse en un ambiente con un pH mayor que 8. Bajo condiciones de laboratorio<sup>1</sup> se han observado elevados porcentajes de parasitismo en larvas de I, II, III y IV estadios de *Culex quinquefasciatus* Say 1823, con valores de 93, 97, 88 y 66 %, respectivamente. Aplicaciones de este mermitido<sup>1</sup> realizadas en el área de Pondicherry (India), en dosis de 1 173 y 312 000 preparasíticos/m<sup>2</sup> de área de superficie, evidenciaron la capacidad parasítica de *R. iyengari* para el control de larvas de mosquito de los géneros *Culex* y *Aedes*.<sup>1</sup> Otros reportes<sup>5</sup> han indicado que *R. iyengari* fue capaz de reducir las poblaciones de *Anophelex albimanus* Wiedeman 1821, *Culex nigripalpus* Theobald 1901 y *C. quinquefasciatus*, cuando los preparasíticos de este mermitido fueron aplicados en dosis de 1 000/m<sup>2</sup> de área de superficie mediante un rociador convencional Holder-planta 5, a una presión de 2 atm. Posterior a la aplicación del mermitido fueron obtenidos niveles de parasitismo entre 75 y 100 %. En el presente trabajo se realizó un estudio para determinar los niveles de susceptibilidad en larvas de *A. aegypti* en distintos estadios larvales al parasitismo de *R. iyengari* en condiciones de laboratorio, en el Estado de Oaxaca, México.

## MÉTODOS

Las pruebas de efectividad para evaluar la capacidad parasítica de *R. iyengari* en larvas de *A. aegypti* se realizaron en uno de los laboratorios del Instituto Politécnico (CIIDIR) del Estado de Oaxaca. Para el desarrollo de los experimentos se colectó un total de 800 larvas de I estadio, 800 de II, 800 de III y 800 de IV estadio, en reservorios naturales conformados por neumáticos, depósitos de fibra de vidrio de 1 m<sup>2</sup> de área y depósitos de aluminio, localizados a la intemperie en los alrededores de dicho Instituto. Para la colecta de las larvas se utilizó un pequeño jamo de 10 x 10 cm con fondo de malla de nylon de 7 cm de profundidad, y posteriormente fueron trasladadas al laboratorio en cubetas de 3 L de capacidad con aguas provenientes de los criaderos donde fueron colectadas las larvas. Una vez en el laboratorio las larvas se dispusieron en 2 grupos de 1 200 larvas cada uno, distribuido cada grupo, a su vez, en 4 subgrupos de 300 larvas de I estadio, 300 larvas de II, 300 larvas de III y 300 larvas de IV estadio. Cada subgrupo de

300 larvas se dispuso a razón de 100 larvas, a los efectos de realizar 3 réplicas por cada estadio larval. Por cada grupo de 1 200 larvas se estableció un control compuesto por 100 larvas en II estadio de desarrollo. Todas las larvas se colocaron en depósitos plásticos de color blanco de 34 x 19 x 7 cm, en aguas típicas de esta especie. Se calcularon además los valores de algunos parámetros físico-químicos del agua tales como pH, conductividad, oxígeno y cloruros, con el objetivo de evaluar la influencia de éstos en la capacidad parasítica de los juveniles infectivos de *R. iyengari*. Los experimentos se desarrollaron a una temperatura de 28 °C. Para determinar los niveles de susceptibilidad al parasitismo del mermitido de los 4 estadios larvales se ensayaron las dosis de 10:1 y 20:1 (10 y 20 preparasíticos por larva de mosquito), para lo cual se utilizaron 4 cultivos de *R. iyengari* producidos en el Laboratorio de Nematodos del Instituto de Medicina Tropical «Pedro Kourí» (IPK), en Ciudad de La Habana, Cuba. Los cultivos fueron inundados con agua destilada con pH 5,4 y conductividad de 1,4 ms/cm, a los efectos de promover la eclosión de los huevos y la emersión de las larvas infectivas. Cuatro horas después, el agua que contenía los preparasíticos (inóculo) fue colectada por decantación en un beaker de 1 000 mL de capacidad. Mediante el método de dilución volumétrica<sup>6</sup> se calculó un total de 60 000 preparasíticos, se utilizaron para los ensayos 36 000 larvas infectivas, a razón de 12 000 preparasíticos para el primer grupo de 12 000 larvas con la dosis de 10:1, y 24 000 preparasíticos para el segundo grupo de 12 000 larvas, con la dosis de 20:1. Transcurridas 72 h posterior a la exposición de las larvas de mosquitos a los parasíticos infectivos, se tomaron muestras aleatorias de 50 larvas por cada réplica de 100 larvas de cada estadio larval y éstas fueron disecadas mediante agujas entomológicas a través de un microscopio estereoscópico, con el objetivo de determinar las medias de infestación y los porcentajes de parasitismo en las larvas.

Todos los datos obtenidos fueron analizados estadísticamente. De forma previa se comprobó que éstos no presentaban distribución normal y homogeneidad de varianza, por lo que fueron transformados a  $\sqrt{x}$ . Para cada grupo de 1 200 larvas se utilizó un ANOVA simple para determinar la existencia de diferencias significativas entre los valores medios y

una prueba Duncan para establecer las diferencias entre las medias de los 4 estadios larvales.

## RESULTADOS

Las pruebas de laboratorio para determinar la capacidad patogénica de *R. iyengari* en larvas de *A. aegypti* y el efecto inmediato de las aguas de los reservorios sobre los preparasíticos infectivos, arrojaron elevados niveles de parasitismo, con valores de 90, 93, 91 y 85 % en larvas de I, II, III y IV estadios, respectivamente, con la dosis de 10:1; y valores del orden de 98, 97, 93 y 89 % en larvas de I, II, III y IV estadios, respectivamente, con la dosis de 20:1 (tabla).

**TABLA.** Promedios de infestación y porcentajes de mortalidad en diferentes estadios larvales de *A. aegypti* por *R. iyengari* a distintas dosis en condiciones de laboratorio

Dosis	No. de larvas	Estadios larvales	Infestación (x)	Mortalidad (%)
10:1	300	I	1,78a	90
	300	II	1,88a	93
	300	III	1,83a	91
	300	IV	1,20b	85
Control	100	II	-	-
20:1	300	I	2,75a	98
	300	II	2,55a	97
	300	III	2,15a	93
	300	IV	1,71b	89
Control	100	II	-	-

Letras iguales no difieren estadísticamente. Letras desiguales difieren estadísticamente a  $p < 0,05$ .

Mediante la aplicación de un ANOVA se encontraron diferencias significativas entre los valores medios de los 4 estadios larvales para la dosis más baja de 10:1 ( $F = 2,8032$ ;  $p < 0,001$ ). Mediante la prueba Duncan ( $p < 0,05$ ) se determinó que la media de infestación con valor de 1,20 del estadio IV difiere de los valores medios de los estadios I, II y III, no se observaron diferencias entre éstos. Para la dosis de 20:1 la aplicación de un ANOVA arrojó igualmente diferencias entre los valores medios de infestación de los 4 estadios larvales ( $F = 3,3746$ ;  $p < 0,001$ ). La prueba Duncan ( $p < 0,05$ ) determinó que el valor medio de infestación de 1,71 del estadio IV difiere de los valores medios de los estadios I, II y III, no se encontraron diferencias entre éstos.

Con la dosis más elevada de 20:1, 24 h después de los tratamientos realizados, se observó un total de 72 larvas muertas de I estadio, a razón de 23, 25 y 24 larvas por cada réplica de 100 larvas; 49 larvas muertas de II estadio, a razón de 19, 16 y 14 larvas por cada réplica de 100 larvas; y 32 larvas muertas de III estadio, en una relación de 10, 13 y 9 larvas por cada réplica de 100 larvas. A diferencia de esto, en los controles establecidos no se observó alteración alguna. La mortalidad ocurrida en las larvas a las 24 h de haberse realizado las aplicaciones se atribuye al efecto patogénico causado por el superparasitismo.

## DISCUSIÓN

Se ha reportado la susceptibilidad manifestada por las larvas de *A. aegypti* al parasitismo de *R. iyengari*. Diferentes pruebas de laboratorios indicaron que larvas de esta especie expuestas a los preparasíticos infectivos del mermitido arrojaron 98 % de parasitismo.<sup>2</sup> Resultados muy similares fueron obtenidos en el presente trabajo cuando larvas de I a IV estadio de desarrollo resultaron infectadas por los preparasíticos del mermitido en dosis de 10:1 y 20:1.

Se evidenció que la mayor incidencia del parasitismo tuvo lugar en los estadios más jóvenes I y II para ambas dosis: se encontró, además, que con la dosis mayor (20:1) ocurrieron los mayores índices de infestación, lo que indicó que el parasitismo en larvas aumenta con el incremento de la dosis de aplicación. En trabajos realizados previamente en condiciones de campo con *R. iyengari* para el control de poblaciones naturales de *A. albimanus*, *C. nigripalpus* y *C. quinquefasciatus* se demostró igualmente que los estadios más jóvenes I y II resultaron ser más vulnerables a la invasión de las larvas infectivas.<sup>7</sup> La mayor susceptibilidad en los estadios más jóvenes al parasitismo del nematodo se explica por el poco desarrollo alcanzado y la escasa formación de quitina en su pared cuticular, lo que da lugar a que ésta resulte más suave, y facilita a su vez la invasión por parte de las larvas infectivas mediante su estilete. Fue observada una reducción en la velocidad de crecimiento y el desarrollo de las larvas, principalmente en los estadios I, II y III, con la dosis mayor (20:1) como resultado de la acción patogénica a con-

secuencia del superparasitismo. Esto se traduce en trastornos fisiológicos que ocurren en las larvas parasitadas, como cambios radicales en su hemolinfa cuando se compara con individuos normales (no parasitados). Además, los carbohidratos solubles y las proteínas son reducidos severamente.<sup>8-10</sup> Se ha reportado también, que el parasitismo provocado por esta especie de mermítico en larvas de mosquito conduce a una reducción en los niveles de piruvato, lo que sugiere una disrupción en los carbohidratos normales y en el metabolismo del nitrógeno (indicativo de un fuerte estrés fisiológico).<sup>11</sup> A diferencia de esto, en larvas de IV estadio el parasitismo no afectó el tránsito a la fase de pupa y éste transcurrió normalmente hasta la fase de adulto.<sup>12</sup>

Los valores de los diferentes parámetros físico-químicos como pH (9,47), conductividad (151,8 ms/cm), temperatura (24 °C), oxígeno (9 mg/L) y cloruros (5,86 mg/L), aparentemente no tuvieron un efecto negativo en la motilidad y capacidad infectiva de los preparásitos de *R. iyengari*. Los resultados hallados con la aplicación de *R. iyengari* en aguas con pH 9,47 difiere de lo señalado en la literatura, la cual reporta que los estados infectivos de este nematodo no pueden sobrevivir en aguas con valores de pH mayores que 7,5.<sup>3,4</sup> Los resultados hallados en este trabajo evidenciaron que *R. iyengari* puede ser utilizado en criaderos cuyas aguas presentan un pH por encima del reportado por la literatura, y demuestran, a su vez, que puede constituir un efectivo agente de control biológico contra la fase larval de *A. aegypti* en el Estado de Oaxaca, México.

Aunque los resultados obtenidos han demostrado la alta susceptibilidad de *A. aegypti* al parasitismo por *R. iyengari*, por las características ecológicas de esta especie de mosquito de proliferar mayormente en muy bajas densidades larvales en reducidos criaderos constituidos por pequeños recipientes, resulta mucho más práctico dirigir su control mediante la eliminación de estos focos o reservorios, lo que evita la formación de nuevos criaderos.

#### AGRADECIMIENTOS

Los autores del presente trabajo desean agradecer el apoyo brindado a esta investigación por los técnicos *Gonzalo Flores Ambrosio* e *Inocencio Rodríguez Acevedo* del Instituto Politécnico (CIIDIR) y al estudiante *Sabino Honorio Martínez Tomás* de la carrera de Ingeniería en Agronomía, del Instituto Técnico Agropecuario, ambos del Estado de Oaxaca.

#### SUMMARY

Laboratory tests with waters from *Aedes aegypti* Linnaeus (1762) breeding places were made to determine the pathogenic effect of the mermithid nematode *Romanomermis iyengari* Welch 1964 in mosquito larvae of this species. According to the results obtained, the administration of a dosage of 10:1 (10 preparasitics per mosquito larvae) showed levels of parasitism of 90, 93, 91, and 85 % in mosquito larvae in the I, II, III, and IV stage, respectively. With the highest dosage of 20:1 (20 preparasitics per mosquito larvae) there were obtained levels of parasitism with values of 98, 97, 93 and 89 % among larvae in the I, II, III, and IV stage, respectively. Generally, the values of the physical and chemical parameters such as pH, conductivity, oxygen, and chlorides calculated in these waters did not affect apparently the infective capacity of the preparasitics of *R. iyengari*.

**Subject headings:** NEMATODA/pathogenicity; LARVA/parasitology; AEDES/parasitology; MOSQUITO CONTROL; LABORATORIES, MEXICO.

#### REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Gajanana A, Kazmi SJ, Bheema Rao US, Suguna SG, Chandrahas RK. Studies on a nematode parasite (*Romanomermis* sp.: Mermithidae) of mosquito larvae isolated in Pondicherry. *Indian J Med Res* 1978;68:242-7
- Chandras 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.
- Bheema Rao US, Gajanana A, Rajagopalan PK. A note on the tolerance of the mermithid nematode *Romanomermis* sp. to different pH and salinity. *Indian J Med Res* 1979;69:423-7.
- Indian Council Medical Research. Vector Control Research Centre. Studies on mermithid nematode *Romanomermis iyengari*. Vector Control Research Center: Indira Nagar, Pondicherry, 1978:64-9.
- Santamarina MA, García Ávila I, González Broche R. Capacidad infectiva del nematodo parásito *Romanomermis iyengari* (Welch, 1964) (Nematoda: Mermithidae) en larvas de mosquitos en condiciones naturales. *Rev Cubana Med Trop* 1992;44(2):92-7.
- Petersen JJ, Willis OR. Procedures for the mass rearing of a mermithid parasite of mosquitoes. *Mosq News* 1972;2:226-30.
- Santamarina MA. Actividad parasitaria de *Romanomermis iyengari* (Nematoda: Mermithidae) en criaderos naturales de larvas de mosquitos. *Rev Miscelánea Zool* 1993-1994;17:59-65.
- Schmidt S, Platzer E. An investigation of possible *Romanomermis culicivora* proteins in the hemolymph of *Culex pipiens*. *J Invest Pathol* 1980;36:149-58.
- Schmidt S, Platzer E. Changes in body tissues and hemolymph composition of *Culex pipiens* in response to infection by *Romanomermis culicivora*. *J Invest Pathol* 1980;36:240-54.
- Gordon R. Mermithid nematodes: physiological relationship with their insect hosts. *J Nematol* 1981;13:266-74.
- Womersley C, Platzer E. The effect of mermithid parasitism on hemolymph pyruvate levels in mosquito larvae. *J Nematol* 1981;13:464.
- Santamarina MA, González Broche R. Estudio sobre la infección y el desarrollo parasítico de *Romanomermis culicivora* en larvas de *Anopheles albimanus* en condiciones de laboratorio. *Rev Cubana Med Trop* 1988;40:27-31.

Recibido: 11 de marzo de 1996. Aprobado: 16 de enero de 1997.  
Dr. *Raúl Santamarina Mijares*. Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kouri". Apartado 601, Marianao 13, Ciudad de La Habana, Cuba.