

INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL, OAXACA, MÉXICO

## Susceptibilidad de las larvas de *Anopheles pseudopunctipennis* al parasitismo del nematodo *Romanomermis iyengari* (Nematoda: Mermithidae), Estado de Oaxaca, México

Ing. Rafael Pérez Pacheco,<sup>1</sup> Lic. Alberto Santamarina Mijares,<sup>2</sup> Ing. Sabino Honorio Martínez,<sup>3</sup> y Téc. Gonzalo Flores Ambrosio<sup>4</sup>

### RESUMEN

Se realizó un estudio con larvas de mosquito de la especie *Anopheles pseudopunctipennis* Theobald 1901, en condiciones de laboratorio y de campo para evaluar los niveles de susceptibilidad al parasitismo del nematodo *Romanomermis iyengari* Welch 1964. Para los ensayos de laboratorio se utilizaron las dosis de 5:1 y 10:1, y larvas de II estadio de desarrollo, colectadas en reservorios naturales. Para los experimentos de campo se aplicó una dosis de 1 000 preparasíticos/m<sup>2</sup> de área de superficie. Los resultados hallados tanto en las pruebas de laboratorio como de campo arrojaron elevados niveles de infectación en las larvas, con valores de 90 a 100 % y de 85 a 95 %, respectivamente. Se observó una reducción marcada de las densidades larvianas en los 5 reservorios tratados 7 d después de las aplicaciones, lo que demostró una elevada susceptibilidad en esta especie de anofelino al parasitismo del mermítido.

**Descriptor DeCS:** ANOPHELES/parasitología; CONTROL DE MOSQUITOS/métodos; NEMATODOS; MEXICO.

El paludismo constituye una de las enfermedades de mayor incidencia en determinadas áreas del planeta, en las cuales las condiciones de pobreza propician su diseminación.

El Estado de Oaxaca, México, se localiza en la vertiente del Pacífico y está considerado área palúdica en una gran extensión, debido a que en ella predominan temperaturas promedio entre los 24 y 26 °C, con picos máximos de hasta 33 °C en los meses de agosto a octubre. Asimismo, los niveles de precipitación total anual máximos y mínimos, con valores de 731,9 y 2 054,9 mm, respectivamente, determinan las condiciones para que el mosquito *Anopheles pseudopunctipennis*, vector responsable del agente causal del paludismo en el

mencionado estado, se desarrolle de forma favorable. A partir de 1989, se implantó como una estrategia más el Programa de Acciones Intensivas Simultáneas, mediante la campaña Nacional de Erradicación del Paludismo, el cual consistió en combinar de manera simultánea las actividades de rociado químico domiciliario, antilarvario y espacial. Aún así, en algunos estados del litoral del Pacífico como Chiapas, Oaxaca y Sinaloa entre otros, ha sido más difícil el control físico del vector.<sup>1</sup>

En los últimos años se le han conferido una importancia relevante a los métodos de lucha biológica contra los mosquitos, como alternativa a los métodos químicos. El uso de agentes biológicos que son patógenos para las larvas de anofelinos ha sido amplia-

<sup>1</sup> Master en Ciencias Agrícolas. Instituto Politécnico Nacional, CIIDIR-Oaxaca, México.

<sup>2</sup> Doctor en Ciencias Biológicas. Investigador Auxiliar. Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí".

<sup>3</sup> Ingeniero Agrónomo. Instituto Politécnico Nacional, CIIDIR-Oaxaca, México.

<sup>4</sup> Técnico. Instituto Politécnico Nacional. CIIDIR-Oaxaca, México.

mente considerado por la OMS. Las investigaciones dirigidas para la posible utilización de agentes naturales contra los vectores de la malaria han demostrado que algunos de ellos, como los nematodos parásitos del género *Romanomermis* pudieran constituir efectivos agentes de control.<sup>2</sup> La especie *Romanomermis iyengari* Welch 1964, ha sido reportada en la India;<sup>3</sup> algunos estudios realizados sobre su capacidad infectiva han evidenciado su potencial para reducir las densidades larvianas de los mosquitos en los reservorios naturales de los países tropicales.<sup>4</sup> La especie *R. iyengari* fue primero encontrada en el área de Pondicherry, India, en forma parásita juvenil en el hemocele de larvas de mosquitos de *Anopheles sp.*<sup>5</sup> Bajo condiciones de laboratorio fueron hallados altos rangos de infectación en larvas de *Aedes sp.*, *Anopheles sp.* y *Culex sp.*, con valores de 92, 80 y 77 % de parasitismo, respectivamente. Otras investigaciones en el terreno han mostrado la capacidad de perpetuación del parásito en el sustrato de los criaderos posterior a su aplicación.<sup>6</sup>

En el presente trabajo se reportan los resultados hallados de las pruebas de efectividad realizadas para evaluar la capacidad infectiva de *R. iyengari* en larvas de *A. pseudopunctipennis*, en condiciones de laboratorio y de campo.

## MÉTODOS

Para las pruebas de laboratorio se colectaron y seleccionaron 750 larvas de mosquito de la especie *A. pseudopunctipennis* en II estadio de desarrollo, en reservorios naturales localizados en la periferia del Distrito de Pochutla, en el Estado de Oaxaca, México. Las larvas fueron trasladadas en aguas propias de los criaderos, en depósitos plásticos de 1 000 mL de capacidad. Una vez en el laboratorio el material colectado fue distribuido en 2 grupos de 300 larvas y cada grupo a su vez en 3 réplicas de 100 larvas, colocadas en recipientes plásticos de 32 x 24 x 5 cm, en aguas típicas de los reservorios. Otro grupo de 50 larvas en II estadio se tomó como control para comparar los resultados obtenidos. Tres cultivos de *R. iyengari* provenientes del laboratorio de nematodos del Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí" (IPK), en Ciudad de La Habana, Cuba, fueron inundados con agua destilada, con el objetivo de promover la eclosión de los huevos y la emersión de los juveniles infectivos. Cuatro horas después se colectó el inóculo (agua que contenía las larvas infectivas), se calculó un volumen de 1 200 mL, lo que arrojó un total de 288 000 larvas infectivas, lo cual se determinó mediante el método de dilución volumétrica.<sup>7</sup> Fueron ensayadas las dosis mínima y máxima de 5:1 y 10:1 (5 y 10 preparasíticos por larva de mosquito).<sup>8,9</sup> Se realizaron 3 réplicas por cada dosis.

Para las pruebas en condiciones de campo a pequeña escala, se tomaron 5 reservorios de un área de 25, 23, 20, 18 y 15 m<sup>2</sup>, con aguas limpias y presencia de vegetación (limus), ubicados a 10 km del Distrito de Pochutla. Se realizó una evaluación pretratamiento previamente a las aplicaciones, lo que indicó la presencia de 990, 1 056, 900, 1 112 y 1 027 larvas de *A. pseudopunctipennis* de I a IV estadio de desarrollo, de forma respectiva. Se determinó además, la presencia de algunos insectos acuáticos como odonatos, hemípteros y coleópteros, componentes de la fauna asociada con las larvas de mosquito. También se calcularon los valores de algunos parámetros físico-químicos del agua como pH, conductividad y oxígeno disuelto, con valores promedios de 7,2; 110m/cm y 7,1 mg/L; para lo cual se utilizaron un pHmetro, un conductímetro y un oxímetro de campo, respectivamente. La temperatura del agua fue calculada en el momento de las aplicaciones, con un valor de 31 °C, se utilizó un termómetro convencional de alcohol con escala de 0 a 200 °C.

Para las aplicaciones de campo se tomó una dosis de 1 000 preparasíticos/m<sup>2</sup> de área de superficie, para un total de 25 000, 23 000, 20 000, 18 000 y 15 000 larvas infectivas por cada reservorio, respectivamente; obtenidas de los cultivos utilizados al inicio. Los rociados del biolarvicida en los criaderos se realizó con un aspersor manual Hudson, a una presión de 2 atm, lo que permitió la dispersión uniforme de los juveniles infectivos. Se colocó un testigo, consistente en un criadero de 7 m<sup>2</sup> y una densidad larvaria de 980 larvas de I a IV estadio. Para la colecta de las larvas, tanto para las pruebas de laboratorio como de campo, se utilizó un jamo de colecta de 10 cm de radio, con fondo de malla de nylon de 20 cm de profundidad y un mango largo de 2 m de longitud.<sup>10</sup> Tres días después de las aplicaciones se tomó de forma aleatoria una muestra de 50 larvas por cada réplica de laboratorio y por cada reservorio, las que fueron disecadas con agujas entomológicas y a través de un microscopio estereó, con el fin de calcular las medias de infectación y los porcentajes de parasitismo.

Los datos obtenidos fueron analizados de forma estadística, para lo cual fueron transformados a  $\sqrt{x}$  ya que no presentaban distribución normal. Se utilizó un ANOVA de clasificación simple para la comparación de los 6 valores medios de infectación obtenidos en las 6 réplicas de las pruebas de laboratorio con ambas dosis y una prueba Duncan para establecer las diferencias entre medias. Para la comparación de los 5 valores medios de infectación de las pruebas de campo se utilizó un ANOVA de clasificación simple. Para calcular los porcentajes de reducción de larvas en los criaderos, se aplicó la ecuación

de Lawrence y Mulla,<sup>11</sup> se compararon las densidades larvarias pre y postratamiento, donde:

$$\% \text{ de reducción} = 100 - \frac{C_1}{T_1} \times \frac{T_2}{C_2} \times 100$$

$C_1$  es la abundancia de larvas en el control y  $T_1$  en el sitio de la prueba antes del tratamiento, y  $C_2$  y  $T_2$  son la abundancia de larvas en el control y en el sitio de prueba después del tratamiento, respectivamente.

## RESULTADOS

La aplicación de ambas dosis en las pruebas de laboratorio revelaron que los mayores niveles de parasitismo correspondieron a la dosis más elevada de 10:1. La comparación mediante un ANOVA simple de los 6 valores medios obtenidos arrojó diferencias significativas ( $F = 14,6$ ;  $p < 0,001$ ). La prueba Duncan ( $p < 0,005$ ) indicó que los valores medios hallados con la dosis más alta difieren de los promedios de infectación observados con la dosis más baja (tabla 1). Para ambas dosis se evidenció una elevada susceptibilidad de las larvas de anofelinos al ataque de los preparásitos infectivos de *R. iyengari*.

**TABLA 1.** Niveles de infectación y porcentajes de parasitismo en larvas de *Anopheles pseudopunctipennis* por *Romanermis iyengari* en el laboratorio

No. de réplicas	Dosis	No. de larvas	Estadio	( $\bar{x}$ ) Infectación	(%) Parasitismo
1	5:1	100	II	3,6a	95
2		100	II	2,7a	82
3		100	II	3,7a	94
4	10:1	100	II	6,6b	100
5		100	II	7,0b	100
6		100	II	7,6b	100
Testigo	-	50	II	-	-

Medias con letras diferentes fueron significativamente diferentes ( $F = 14,6$ ;  $p < 0,001$ ).

La comparación mediante un ANOVA simple de los 5 valores medios de infectación obtenidos en las pruebas de campo (5,0; 5,2; 4,9 y 5,1) no arrojaron diferencias significativas. En las 5 muestras de campo analizadas se pudo constatar que los 4 estadios larvales de *A. pseudopunctipennis* resultaron parasitados por *R. iyengari*, se encontró entre 85 y 95 % de parasitismo en las larvas. Siete días después de los tratamientos se determinó la densidad larvaria relativa (DRL) por cada

criadero, la que se comparó con la densidad larvaria relativa pretratamiento. Mediante la ecuación de Lawrence y Mulla<sup>11</sup> se encontró una acentuada reducción de las poblaciones de larvas en los 5 reservorios, con valores entre 94 y 96 % (tabla 2).

**TABLA 2.** Porcentajes de reducción de la densidad larvaria de *A. pseudopunctipennis* en 5 criaderos 7 d después de los tratamientos

Criaderos	DLR/m <sup>2</sup> pretratamiento	Estadios	DLR/m <sup>2</sup> postratamiento	% reducción
1	990	I-IV	34	96
2	1056	I-IV	56	94
3	900	I-IV	38	96
4	1112	I-IV	45	96
5	1027	I-IV	39	96
T	980	I-IV	-	-

DLR: Densidad larvaria relativa.

## DISCUSIÓN

Las pruebas de laboratorio con *R. iyengari* demostraron que *A. pseudopunctipennis* es altamente vulnerable a la invasión de los preparásitos infectivos del nematodo, además, se observó, un incremento de los niveles de parasitismo con el aumento de la dosis. Este hecho pudiera atribuirse a que los estadios más jóvenes presentan poco desarrollo y por lo tanto existe una escasa formación y deposición de quitina en la pared cuticular, lo que facilita la invasión de las larvas infectivas al interior del hemocele de las larvas hospederas.<sup>12</sup> Esto se traduce en una elevada tasa de parasitismo. Con las aplicaciones efectuadas en el campo se encontró que los 4 estadios larvales resultaron susceptibles y parasitados por *R. iyengari*, aunque se señala de forma general, que durante el examen de las muestras colectadas por cada reservorio, los estadios más tempranos I y II resultaron más vulnerables al ataque del mermítido. El estadio III presentó una mayor susceptibilidad en relación con el estadio IV, pero en este último fue en comparación algo menor que en los estadios I y II. Al parecer, este comportamiento encontrado en los índices de infectación pudiera estar asociado con las características de la pared cuticular de las larvas hospederas, tal y como se señalara anteriormente, la cual varía a través de los diferentes estadios de desarrollo.

Aunque el parasitismo observado en las larvas de *A. pseudopunctipennis* por *R. iyengari* no aparece reportado en la literatura, algunos autores<sup>3-5</sup> han indicado la susceptibilidad de otras especies de anofelinos al ataque de este nematodo.

La comparación de las densidades larvarias antes y después de los tratamientos determinaron altos porcentajes de reducción y revelaron la capacidad de *R. iyengari* para reducir las poblaciones larvales de esta especie vectora de la malaria.

Los valores de los parámetros físico-químicos evaluados en el campo no interfirieron en apariencia con la viabilidad de las larvas infectivas, estos valores coinciden con los reportados en la literatura.<sup>6</sup>

La reducción larval observada en los criaderos tratados en estos estudios iniciales, sugieren la posibilidad del uso de *R. iyengari* para el control de *A. pseudopunctipennis* en el Distrito de Pochutla, área endémica de malaria.

#### AGRADECIMIENTOS

Los autores del presente trabajo expresan su agradecimiento al Programa de Paludismo del Distrito de Pochutla, Estado de Oaxaca, por la colaboración prestada tanto en la localización de los reservorios naturales como en la colecta de larvas.

#### SUMMARY

Mosquito larvae of the species *Anopheles pseudopunctipennis* Theobals 1901 were studied under laboratory and field conditions to evaluate the level of susceptibility to the parasitism of nematode *Romanomermis iyengari* Welch 1964. Doses of 5:1 and 10:1 and development stage II larvae collected in natural reservoirs were used for the laboratory assays. A dose of 1 000 parasitic agents/ m<sup>2</sup> was applied to field trials. The results of the lab and field tests yielded high levels of infestation in larvae with values ranging from 90 to 100 % and from 85 to 95 %, respectively. A marked reduction of the larval densities was observed in the 5 treated reservoirs seven days later, which showed an elevated susceptibility of the anopheline species to mermithid parasitism.

**Subject headings:** ANOPHELES/parasitology; MOSQUITO CONTROL/methods; NEMATODA; MEXICO.

#### REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Henry RM. Paludismo. Enfermedades tropicales en México. México, DF: Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencias Epidemiológicas, 1994:267-77.
2. Rojas W, Northup J, Gallo O, Montoya AE, Montoya F, Restrepo M, et al. Reduction of malaria prevalence after introduction of *Romanomermis culicivora* (Nematoda: Mermithidae) in *Anopheles* larval habitats in Colombia. Bull World Health Organ 1987;65(3):331-7.
3. Chandras RK, Rajagopalan PK. Mosquito breeding and the natural parasitism of larvae by a fungus *Coelomomyces* and a mermithid nematode *Romanomermis* in paddy field in Pondicherry. Indian. J Med Res 1979;69:63-70.
4. World Health Organization. Data sheet on the biological control agent. WHO/VBC/80. 765 1980.
5. Gajanana A, Kazmi SJ, Bheema Rao US, Suguna SG, Chandras RK. Studies on a nematode parasite (*Romanomermis* sp.: Mermithidae) of mosquito larvae isolated in Pondicherry. Indian. J Med Res 1978;68:242-7.
6. Indian Council Medical Research. Studies on mermithid nematode *Romanomermis iyengari*. Vector control research centre-annual report. Center Pondicherry: Ed. Indira Nagar, 1978;64-9.
7. Petersen JJ, Willis OR. Procedures of the mass rearing of a mermithid parasite of mosquitoes. Mosq News 1972;32: 226-30.
8. Petersen J. Role of mermithid nematodes in biological control of mosquitoes. Exp Parasitol 1973;33:239-47.
9. Brown B, Platzer E, Hughes D. Field trials with the mermithid nematode *Romanomermis culicivora* in California. Mosq News 1977;37:603-8.
10. Dubitskij AM. Métodos de control biológico de los dípteros hematófagos en la URSS. Alma Atá: Publishing House of Kazakh Academy of Sciences, 1978;11:165.
11. Lawrence L, Mulla MS. Field evaluation of difluobenzuron (Dimilin) against simuliun larvae. Mosq News 1979; 39:86-90.
12. Petersen JJ, Willis OR. Experimental release of mermithid nematode to control *Anopheles* mosquitoes in Louisiana. Mosq News 1974;34:316-9.

Recibido: 17 de julio de 1997. Aprobado: 19 de abril de 1998.  
Ing. Rafael Pérez Pacheco. Instituto Politécnico Nacional. Oaxaca, México.