

ARTÍCULO ORIGINAL

## Ensayos de sensibilidad de larvas de *Aedes aegypti* y *Culex quinquefasciatus* frente al nematodo *Heterorhabditis bacteriophora* en condiciones de laboratorio

Carolina Ulvedal<sup>1</sup>, María Alejandra Bertolotti<sup>1</sup>, Susana Raquel Cagnolo<sup>1</sup>, Walter Ricardo Almirón<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Cátedra de Parasitología, Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, Argentina

<sup>2</sup> Instituto de Investigaciones Biológicas y Tecnológicas, CONICET, Centro de Investigaciones Entomológicas de Córdoba, Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, Argentina

**Introducción.** *Aedes aegypti* es el vector de los virus del dengue, la fiebre amarilla, el Zika y el chikungunya, y *Culex quinquefasciatus*, de los virus de la encefalitis de Saint Louis y de la del Oeste del Nilo.

**Objetivo.** Evaluar la capacidad infecciosa de *Heterorhabditis bacteriophora* N4 en larvas de *C. quinquefasciatus* y *A. aegypti* en el laboratorio.

**Materiales y métodos.** Treinta larvas de segundo estadio de cada especie de mosquito se expusieron a diferentes dosis (0:1, 1:1, 5:1, 15:1, 100:1, 500:1, 750:1 y 1.500:1) de ejemplares juveniles infectivos del nematodo. Se hicieron cuatro réplicas por dosis.

**Resultados.** El parasitismo varió entre 2,5 y 80 % en *C. quinquefasciatus* y entre 4,2 y 92,5 % en *A. aegypti*, con diferencias significativas entre las dosis ( $p < 0,0001$ ). Las  $DL_{50}$  fueron de 160,8 ejemplares juveniles infectivos por larva de *C. quinquefasciatus* y 113,6 por larva de *A. aegypti*; 4 a 6 % de los ejemplares juveniles infectivos llegaron a la fase adulta en *C. quinquefasciatus*, y 12 a 61 % en *A. aegypti*. Nuevos ejemplares juveniles infectivos aparecieron a partir de la dosis de 100:1. En *A. aegypti* aparecieron solo con dosis superiores a esta y, en *C. quinquefasciatus*, con una dosis de 1500:1. Se observó melanización de los ejemplares juveniles infectivos en las dos especies de mosquitos.

**Conclusión.** Se estableció la sensibilidad de estas especies de mosquitos al parasitismo producido por un aislamiento autóctono de *H. bacteriophora* en condiciones de laboratorio y su potencial efecto como agente de control biológico.

**Palabras clave:** *Aedes aegypti*; *Culex quinquefasciatus*; control biológico de vectores; nematodos.

doi: <https://doi.org/10.7705/biomedica.v34i2.3470>

### Laboratory susceptibility tests of *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus* larvae to the entomopathogenic nematode *Heterorhabditis bacteriophora*

**Introduction:** *Aedes aegypti* is the vector of dengue, yellow fever, Zika and Chikungunya viruses, and *Culex quinquefasciatus* is the vector of St. Louis and West Nile encephalitis viruses.

**Objective:** To evaluate infectivity of *Heterorhabditis bacteriophora* N4 in *C. quinquefasciatus* and *A. aegypti* larvae under laboratory conditions.

**Materials and methods:** Thirty second-instar larvae of the two mosquito species were exposed each to different doses (0:1, 1:1, 5:1, 15:1, 100:1, 500:1, 750:1 and 1,500:1) of nematode infective juveniles. Four replications per dose were performed.

**Results:** Parasitism varied between 2.5 and 80 % in *C. quinquefasciatus*, and between 4.2 and 92.5 % in *A. aegypti*, with significant differences between doses ( $p < 0.0001$ ).  $DL_{50}$  were: 160.8 infective juveniles per larva for *C. quinquefasciatus* and 113.6 infective juveniles per larva for *A. aegypti*. In *C. quinquefasciatus*, 4 to 6 % of the infective juveniles developed to adults and in *A. aegypti*, 12- 61 %. In *A. aegypti* the emergence of new infective juveniles occurred with 100:1, 500:1, 750:1 and 1,500:1 infective juveniles per larva, and in *C. quinquefasciatus*, with 1,500:1 infective juveniles per larva. Melanization of infective juveniles was observed in both mosquito species.

#### Contribución de los autores:

Carolina Ulvedal: cría de mosquitos, realización de pruebas, recolección y análisis de datos

María A. Bertolotti: multiplicación del nematodo

Susana R. Cagnolo: detección del aislamiento del nematodo utilizado y asesoría metodológica en las pruebas

Walter R. Almirón: dirección del trabajo

Todos los autores participaron en la escritura del manuscrito.

**Conclusion:** The susceptibility of these mosquito species to parasitism of an indigenous isolate of *H. bacteriophora* in the laboratory was demonstrated. *Heterorhabditis bacteriophora* N4 could be an efficient biological control agent.

**Key words:** *Aedes aegypti*; *Culex quinquefasciatus*; pest control, biological; nematoda.

doi: <https://doi.org/10.7705/biomedica.v34i2.3470>

Los mosquitos constituyen uno de los grupos de insectos de mayor importancia médica y veterinaria, pues sirven de vectores de agentes patógenos (1). *Aedes aegypti* (L) y *Culex quinquefasciatus* Say son dos de las especies más comunes en los ecosistemas urbanos y están estrechamente asociadas al hombre, quien les ofrece las condiciones adecuadas para su proliferación: refugio, criaderos y alimento.

*Aedes aegypti* se encuentra en las regiones tropicales y subtropicales del mundo, aunque también en zonas templadas (2). En Argentina, el mosquito es de amplia distribución: desde el norte del país hasta la provincia de Neuquén (3).

Entre los arbovirus presentes en Argentina y transmitidos por *A. aegypti*, pueden mencionarse los *Flavivirus* del dengue (DENV), la fiebre amarilla (YFV) y el Zika (ZIKV), y el *Alfavirus* del chikungunya (CHIKV); estos dos últimos circulan desde 2015 y 2016, respectivamente (4-7).

El dengue se presenta en zonas urbanas y semiurbanas, y en algunos países asiáticos y latinoamericanos; causa la forma grave de la enfermedad e incluso la muerte en menores (8). En el 2015 se notificaron 2.350.000 casos tan solo en la región de las Américas, de los cuales más de 10.200 se diagnosticaron como dengue grave y provocaron 1.181 defunciones. En Argentina, la reaparición del dengue se registra desde 1998. Según los datos epidemiológicos publicados en abril de 2016, en los últimos siete años los casos autóctonos se han incrementado en 70 % (9).

En cuanto a *C. quinquefasciatus*, este transmite el virus de la encefalitis de Saint Louis (SLEV), el cual se distribuye ampliamente en las Américas, y en Argentina abarca zonas subtropicales y templadas (10). Según los datos de las pruebas serológicas,

la especie se ha detectado en provincias del centro y el noroeste, y en el sur hasta la provincia de Río Negro (11). Desde el 2002, se ha registrado su reaparición como agente etiológico de encefalitis en humanos en el cono sur del continente (11,12). En Argentina, el brote más grande ocurrió en la provincia de Córdoba en el 2005, con 48 casos y nueve defunciones. En el 2011 se produjo un brote en la ciudad de San Juan y, posteriormente, se registraron otros brotes en la provincia de Buenos Aires y en provincias del norte y del litoral se detectaron algunos casos aislados (13).

*Culex quinquefasciatus* también es transmisor del virus del Nilo Occidental (WNV) en Argentina (Bornancini V, Estallo E, Batallán G, Grech M, Visintín A, Frías-Céspedes M, *et al.* Variables ambientales satelitales y su relación con la abundancia de las especies de mosquitos (Diptera: Culicidae) sanitariamente más importantes de la ciudad de Córdoba, Argentina. IX Jornadas Regionales de Mosquitos. Universidad Nacional del Nordeste. 4 - 5 de septiembre de 2014. Resistencia, Chaco); este virus se aisló por primera vez en nuestro país en el 2006, lo cual correspondió al primer registro en Suramérica (14). Durante el 2006 y el 2007, se detectaron casos humanos de encefalitis en los cuales se confirmó serológicamente el WNV como el agente etiológico (14).

El control de los mosquitos vectores implica el uso excesivo de sustancias químicas que, además del riesgo de toxicidad que supone para el ser humano y los animales, ha provocado la aparición de resistencia, la eliminación de los controladores naturales del vector y la contaminación del entorno (15). Por estas razones, en las últimas décadas se ha trabajado en la búsqueda de nuevos métodos de control que sean más seguros ambientalmente, entre ellos, el uso de agentes biológicos (15).

Los llamados nematodos 'entomopatógenos' son parásitos obligados de insectos. Su ciclo biológico incluye la fase de huevo, cuatro estadios juveniles y el adulto. Únicamente los ejemplares juveniles infectivos, que corresponden al tercer estadio larval, se desarrollan fuera del insecto y sobreviven en el medio hasta que localizan un huésped (16,17). La presencia de un solo espécimen juvenil infectivo

Correspondencia:

Carolina Ulvedal, Cátedra de Parasitología, Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, Universidad Nacional de Córdoba, Avenida Vélez Sársfield 299 (5000), Córdoba, Argentina  
Teléfono: (54) (351) 535 3800; fax: (54) (351) 433 2098  
[carolinaulvedal@gmail.com](mailto:carolinaulvedal@gmail.com)

Recibido: 02/08/16; aceptado: 21/06/17

dentro del huésped causa su muerte en las 48 horas posteriores al contacto mediante la liberación de una bacteria simbiote que transportan en su intestino. Dado su efecto letal, comparable al de un insecticida químico, constituyen una alternativa interesante como agentes de control biológico (16,18).

En Argentina y en otras regiones del mundo, se han llevado a cabo estudios para evaluar la actividad larvívora de los nematodos entomopatógenos contra *A. aegypti* (19,20) y *Culex pipiens* (21). En Argentina, las pruebas de parasitismo y capacidad infecciosa se han hecho con distintas especies autóctonas de nematodos y mosquitos (22,23). Se ha encontrado que *Steinernema rarum* (OLI) es un eficaz agente de control de larvas de *A. aegypti* (Cagnolo SR, Rivero ME, Almirón WR. Susceptibilidad de larvas de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) al parasitismo por *Steinernema rarum* (OLI) (Nematoda: Steinernematidae), en condiciones de laboratorio. Nematopica. 2007;37:142. Resúmenes de la XXXIX Reunión Anual de Onta. 29 de octubre-2 de noviembre, Villa Carlos Paz, Córdoba, Argentina); contra *C. quinquefasciatus* (Cagnolo S, Almirón WR. Susceptibilidad de larvas de *Culex quinquefasciatus* al parasitismo por *Steinernema rarum* (Nematoda: Steinernematidae) en condiciones de laboratorio. V Jornadas Regionales sobre Mosquitos. La Plata; 2007), y contra *C. apicinus* (24). Por su parte, *Heterorhabditis bacteriophora* N116 parasita larvas de *A. aegypti* (20). No se han hecho pruebas contra *C. quinquefasciatus* con ningún espécimen nativo del género *Heterorhabditis* y, si bien se conoce la sensibilidad de estos mosquitos al parasitismo, en algunos casos se ha observado la melanización del nematodo como reacción de defensa del insecto (20,21).

Aún hay mucho que explorar en este campo si se tienen en cuenta las diferencias intraespecíficas que pueden afectar la capacidad infecciosa de los nematodos entomopatógenos, y que estarían relacionadas con su comportamiento (25), con el insecto y con factores ambientales (26).

En este sentido, los objetivos del presente estudio fueron: 1) determinar y comparar los porcentajes de parasitismo y las  $DL_{50}$  de *H. bacteriophora* N4 en *C. quinquefasciatus* y *A. aegypti*, y 2) constatar el desarrollo y la reproducción de los nematodos dentro de los insectos huéspedes con las diferentes dosis y determinar la aparición de la melanización como reacción inmunitaria de los insectos al parasitismo.

## Materiales y métodos

### **Multiplicación del nematodo y dosis utilizadas**

Se utilizó el aislamiento N4 de *H. bacteriophora*, detectado en el barrio Cerro de las Rosas de Córdoba, provincia de Córdoba, Argentina (Cagnolo SR, Carranza F. Occurrence of entomopathogenic nematodes in private properties in Córdoba Capital City, Argentina. Nematopica. 2007;37:142. Resúmenes de la XXXIX Reunión Anual de Onta. 29 de octubre-2 de noviembre, Villa Carlos Paz, Córdoba, Argentina). Dicho aislamiento se mantiene en cultivo permanente en la Cátedra de Parasitología de la Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales de la Universidad Nacional de Córdoba.

Para la multiplicación del nematodo, se emplearon técnicas convencionales y, como huéspedes auxiliares, se utilizaron larvas de la polilla de la cera *Galleria mellonella* (Insecta: Lepidoptera) (27). En los experimentos se usaron especímenes juveniles infectivos que no superaban los 30 días de almacenamiento desde la fecha de aparición del huésped auxiliar.

### **Obtención de las larvas de mosquitos**

Los ejemplares de *A. aegypti* se obtuvieron del Centro de Investigaciones Entomológicas de Córdoba (CIEC) de la Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales de la Universidad Nacional de Córdoba. La colonia se mantuvo en el laboratorio con las técnicas convencionales (28). Las hembras se alimentaron semanalmente en una rata *Rattus norvegicus*, procedimiento aprobado por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio, CICUAL (Resolución N° 571-HCD- 2014, Acta N° 13- 2016), de la Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales de la Universidad Nacional de Córdoba.

Los ejemplares de *C. quinquefasciatus* utilizados también provenían del CIEC. En el marco de las actividades del programa de vigilancia de la encefalitis de Saint Louis en Córdoba, se recolectaron larvas de mosquitos en criaderos ubicados en distintos puntos de la ciudad, cuya especie se determinó en el laboratorio. Los ejemplares de *C. quinquefasciatus* se criaron bajo condiciones similares a las utilizadas para *A. aegypti*, excepto que las hembras se alimentaron en una codorniz *Coturnix coturnix*, procedimiento también aprobado por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio, CICUAL (Resolución N° 571-HCD- 2014, Acta N° 13 -2016) de la Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales de la Universidad Nacional de Córdoba.

### Experimentos de infección

Las infecciones se llevaron a cabo colocando 30 larvas de mosquito de segundo estadio en bandejas provistas de 80 ml de agua sin cloro y la cantidad adecuada de nematodos en dosis de 0:1, 1:1, 5:1, 15:1, 100:1, 500:1, 750:1 y 1.500:1 especímenes juveniles infectivos por larva de mosquito. Dichas dosis se obtuvieron mediante las técnicas convencionales (27).

Se hicieron cuatro réplicas por dosis en cada especie de mosquito. Las bandejas se mantuvieron a una temperatura entre 25 y 28 °C, con alternancia de 12 horas en los períodos de luz y oscuridad. Las larvas de mosquito se alimentaron diariamente agregando al medio 0,25 mg de hígado en polvo por larva.

Cada 24 horas se hicieron observaciones bajo el estereomicroscopio para registrar la muerte de las larvas de mosquito. El período de observación se extendió hasta el estado de pupa. Las larvas muertas fueron transferidas individualmente a placas de 24 celdas (Falcon N° 3047) y se siguió su evolución por siete días más, observando la transparencia de la cutícula, con el fin de registrar el desarrollo y la reproducción de los nematodos dentro del insecto huésped. Transcurridos los siete días, se disecaron los insectos muertos en cuyo interior no se observaron nematodos por transparencia para verificar si había parasitismo.

Con cada una de las dosis se registraron el número de larvas parasitadas, los estadios larvales en los que se observó parasitismo, el número total de nematodos en las larvas, el número de nematodos que alcanzaron el estado adulto, y los nematodos 'melanzados'. Se calculó la dosis letal 50 ( $DL_{50}$ ) para cada especie de insecto.

### Análisis de los datos

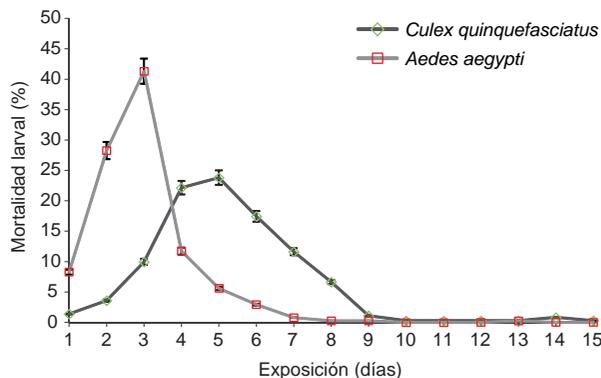
Para detectar diferencias significativas en las variables evaluadas, se hizo un análisis de varianza (ANOVA) de un factor. Las medias se compararon mediante la prueba de diferencia mínima significativa (*Least Significant Difference, LSD*) de Fisher en cada especie. Cuando los datos no siguieron una distribución normal, se aplicó una transformación logarítmica ( $\log_{10}(x+1)$ ). La  $DL_{50}$  se calculó tomando el logaritmo ( $\log_{10}(x+1)$ ) de las dosis y los valores del análisis *probit* de las proporciones de mortalidad. Posteriormente, se hizo un análisis de regresión lineal. Los análisis estadísticos se efectuaron con el programa InfoStat, versión 2013 (29).

### Resultados

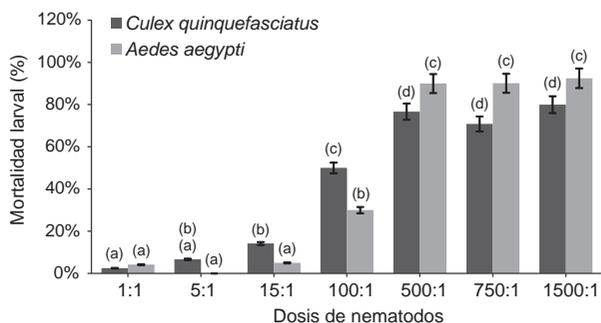
#### Parasitismo y dosis letal 50 ( $DL_{50}$ ) en larvas de *Culex quinquefasciatus* y *Aedes aegypti*

En ambas especies de mosquitos, la mortalidad larval se detectó a las 24 horas del contacto. Los mayores porcentajes de mortalidad en *C. quinquefasciatus* se observaron entre el cuarto y el quinto día (22 y 24 %), y en *A. aegypti*, entre el segundo y el tercero (28 y 41 %) (figura 1).

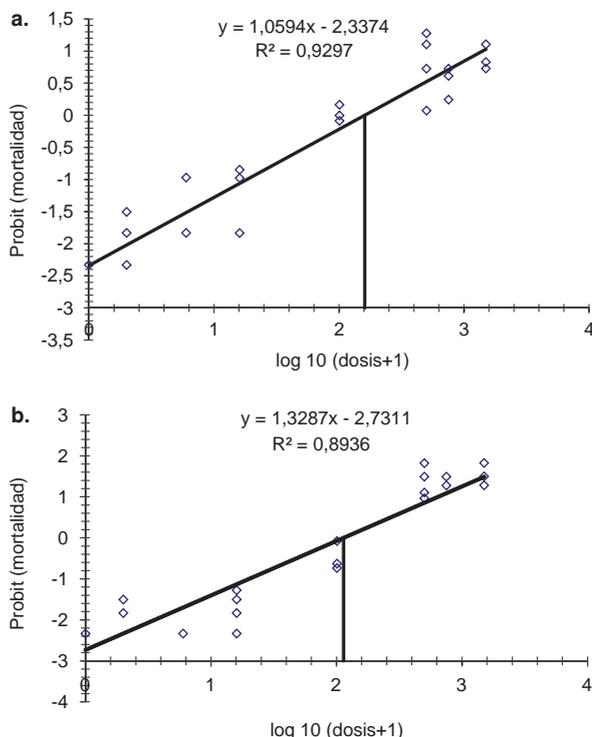
Los valores de parasitismo oscilaron entre 2,5 y 80 % en *C. quinquefasciatus* y entre 4,2 y 92,5 % en *A. aegypti*, con las dosis de 1:1 y 1.500:1, respectivamente. En *C. quinquefasciatus* se registró mortalidad en todas las dosis y, a partir de la dosis de 100:1, los porcentajes superaron el 50 %. En *A. aegypti* no se registró muerte por nematodos con la dosis de 5:1 (figura 2). En ambas especies de mosquitos, los porcentajes de mortalidad se incrementaron a partir de la dosis de 100:1, registrándose diferencias significativas entre esta y las superiores



**Figura 1.** Evolución del parasitismo ( $\pm$  error estándar) en larvas de *Culex quinquefasciatus* y *Aedes aegypti* en función de los días de exposición a las diferentes dosis de *Heterorhabditis bacteriophora* aplicadas



**Figura 2.** Porcentaje ( $\pm$  error estándar) de mortalidad de larvas de *Culex quinquefasciatus* y *Aedes aegypti* en función de las dosis de nematodos aplicadas. Las letras en las barras indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).



**Figura 3.** Dosis letal 50 de *Heterorhabditis bacteriophora*. **a.** *Culex quinquefasciatus*. **b.** *Aedes aegypti*

( $F_{C. quinquefasciatus} = 82,77$ ;  $gl=7$ ;  $p<0,0001$ ) ( $F_{A. aegypti} = 316,22$ ;  $gl=7$ ;  $p<0,0001$ ) (figura 2). Los valores de  $DL_{50}$  fueron de 160,8 especímenes juveniles infectivos por larva para *C. quinquefasciatus* y de 113,6 especímenes juveniles infectivos por larva para *A. aegypti* (figura 3a y 3b).

**Parasitismo en los diferentes estadios larvales**

En las dos especies de mosquitos, los estadios larvales II, III y IV resultaron parasitados por *H. bacteriophora* N4. Independientemente de la dosis aplicada, el tercer estadio presentó los porcentajes más altos de parasitismo, difiriendo significativamente de los estadios restantes ( $F_{C. quinquefasciatus} = 14,58$ ;  $gl=2$ ;  $p<0,0001$ ) y ( $F_{A. aegypti} = 12,58$ ;  $gl=2$ ;  $p<0,0001$ ) (cuadro 1).

**Desarrollo y reproducción de Heterorhabditis bacteriophora dentro de Culex quinquefasciatus y Aedes aegypti**

El porcentaje de larvas parasitadas en las cuales se hallaron nematodos adultos fue mayor en *A. aegypti* que en *C. quinquefasciatus* (17 % Vs. 2 %). En esta última especie, solo se observaron nematodos adultos con la dosis de 1.500:1, en tanto que, en *A. aegypti*, se observaron con todas las dosis superiores a 5:1.

Las disecciones demostraron diferencias en el desarrollo de los nematodos según las dosis. En ambas especies se encontraron individuos adultos con dosis superiores a 5:1, y los valores más altos se registraron a partir de la dosis de 500:1 ( $F_{C. quinquefasciatus} = 14,36$ ;  $gl=7$ ;  $p<0,0001$ ) ( $F_{A. aegypti} = 156,39$ ;  $gl=7$ ;  $p<0,0001$ ) (cuadro 2). En *C. quinquefasciatus*, entre 4 y 6 % de los especímenes juveniles infectivos se desarrollaron a hembras hermafroditas y, en *A. aegypti*, entre 12 y 61 %.

Al final del ciclo parasitario, se constató la aparición de nuevos especímenes juveniles infectivos en el cadáver de los dípteros con las dosis de 100:1, 500:1, 750:1 y 1.500:1 en *A. aegypti* y únicamente con la dosis de 1.500:1 en *C. quinquefasciatus* (figura 4a).

En ambas especies de mosquitos se registraron casos de reacción inmunitaria evidenciada por la presencia de individuos ‘melanzados’ (figura 4b), pero en todos los casos, incluso cuando el nematodo resultó ‘melanzado’, el huésped murió.

En *C. quinquefasciatus*, el 84 % de las larvas parasitadas presentó especímenes juveniles infectivos ‘melanzados’ en su interior y los mayores porcentajes se registraron con las dosis de 500:1 y 750:1 (cuadro 2). Se hallaron diferencias significativas entre las dosis ( $F=74,56$ ;  $gl=7$ ;  $p<0,0001$ ). En *A. aegypti*, el 28 % de las larvas parasitadas mostraron especímenes juveniles infectivos ‘melanzados’, y los mayores porcentajes correspondieron a las dosis de 750:1 y 1.500:1 (cuadro 2). Hubo diferencias significativas entre las dosis ( $F=87,43$ ;  $gl=7$ ;  $p<0,0001$ ).

En las dos especies de mosquitos, además de los especímenes juveniles infectivos ‘melanzados’, se observaron nematodos adultos. Los porcentajes de larvas de mosquitos en esta situación fueron de 14 y 55 % en *C. quinquefasciatus* y en *A. aegypti*, respectivamente. Se presentaron diferencias significativas en el número total de nematodos (nematodos adultos + especímenes

**Cuadro 1.** Porcentaje promedio de parasitismo (± error estándar) por *Heterorhabditis bacteriophora* en los distintos estadios larvales de *Culex quinquefasciatus* y *Aedes aegypti*

	Estadios larvales		
	II	III	IV
<i>Culex quinquefasciatus</i>	5,83 ± 1,40 <sup>a</sup>	23,85 ± 3,85 <sup>b</sup>	7,92 ± 1,79 <sup>a</sup>
<i>Aedes aegypti</i>	4,69 ± 0,99 <sup>a</sup>	27,40 ± 5,77 <sup>b</sup>	6,98 ± 1,72 <sup>a</sup>

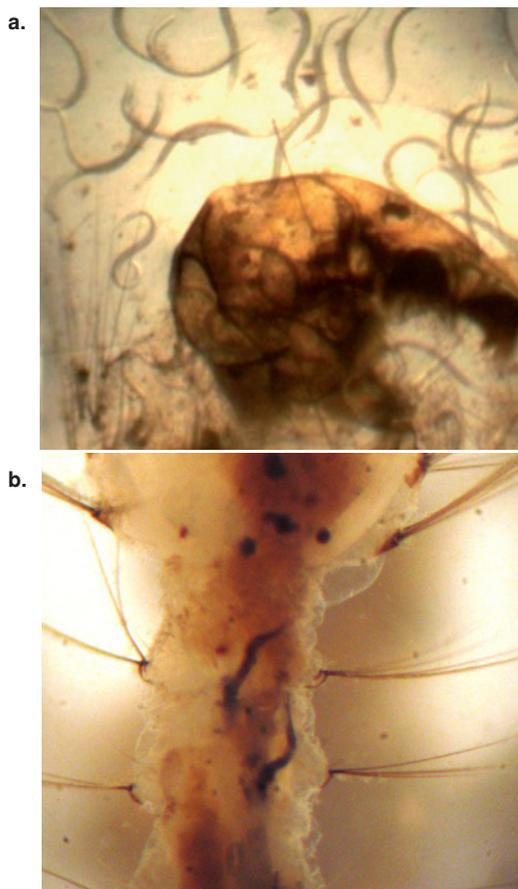
Las letras en superíndice indican diferencias significativas ( $p<0,05$ ).

**Cuadro 2.** Número promedio ( $\pm$  error estándar) de nematodos adultos\*, especímenes juveniles infectivos 'melanzados' y número total de nematodos en el interior de larvas de *Culex quinquefasciatus* y *Aedes aegypti* con las distintas dosis

		Dosis de nematodos							
		0:0	1:1	5:1	15:1	100:1	500:1	750:1	1.500:1
<i>Culex quinquefasciatus</i>	Nematodos adultos*	0 $\pm$ 0 <sup>a</sup>	0 $\pm$ 0 <sup>a</sup>	0 $\pm$ 0 <sup>a</sup>	0,1 $\pm$ 0,1 <sup>a</sup>	0,4 $\pm$ 0,1 <sup>b</sup>	0,7 $\pm$ 0,1 <sup>c</sup>	0,6 $\pm$ 0,1 <sup>bc</sup>	0,8 $\pm$ 0,04 <sup>c</sup>
	Especímenes juveniles infectivos 'melanzados'	0 $\pm$ 0 <sup>a</sup>	1,2 $\pm$ 0,7 <sup>ab</sup>	5 $\pm$ 1,7 <sup>ab</sup>	14,7 $\pm$ 4,5 <sup>b</sup>	52,2 $\pm$ 3,4 <sup>c</sup>	96 $\pm$ 8,8 <sup>e</sup>	88,2 $\pm$ 3,1 <sup>de</sup>	81,7 $\pm$ 8,04 <sup>d</sup>
	Total de nematodos en el insecto	0 $\pm$ 0 <sup>a</sup>	1,2 $\pm$ 0,7 <sup>a</sup>	5 $\pm$ 1,7 <sup>a</sup>	15,5 $\pm$ 4,9 <sup>a</sup>	54,5 $\pm$ 3,5 <sup>b</sup>	101,7 $\pm$ 9,9 <sup>c</sup>	92 $\pm$ 3,7 <sup>c</sup>	87,2 $\pm$ 8,5 <sup>c</sup>
<i>Aedes aegypti</i>	Nematodos adultos*	0 $\pm$ 0 <sup>a</sup>	0 $\pm$ 0 <sup>a</sup>	0 $\pm$ 0 <sup>a</sup>	0,08 $\pm$ 0,1 <sup>a</sup>	1,1 $\pm$ 0,1 <sup>b</sup>	1,7 $\pm$ 0,06 <sup>c</sup>	1,7 $\pm$ 0,1 <sup>c</sup>	1,6 $\pm$ 0,06 <sup>c</sup>
	Especímenes juveniles infectivos 'melanzados'	0 $\pm$ 0 <sup>a</sup>	1,7 $\pm$ 0,2 <sup>a</sup>	0 $\pm$ 0 <sup>a</sup>	1,7 $\pm$ 1 <sup>a</sup>	8,7 $\pm$ 0,4 <sup>ab</sup>	37,7 $\pm$ 2,6 <sup>c</sup>	43,7 $\pm$ 4,7 <sup>cd</sup>	46,7 $\pm$ 3,2 <sup>d</sup>
	Total de nematodos en el insecto	0 $\pm$ 0 <sup>a</sup>	1,7 $\pm$ 0,2 <sup>a</sup>	0 $\pm$ 0 <sup>a</sup>	2 $\pm$ 0,9 <sup>a</sup>	22,2 $\pm$ 5 <sup>a</sup>	97 $\pm$ 10,3 <sup>b</sup>	97 $\pm$ 17,8 <sup>b</sup>	94,2 $\pm$ 7,3 <sup>b</sup>

Las letras en superíndice indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

\*  $\log_{10}$  (número de nematodos adultos + 1)



**Figura 4.** a. Especímenes juveniles infectivos al final del ciclo parasitario en una larva de mosquito. b. Especímenes juveniles infectivos 'melanzados' en el tórax de una larva de mosquito.

juveniles infectivos 'melanzados') que ingresaron en el insecto según la dosis en *C. quinquefasciatus* ( $F=69,34$ ;  $gl=7$ ;  $p < 0,0001$ ) y en *A. aegypti* ( $F=35,95$ ;

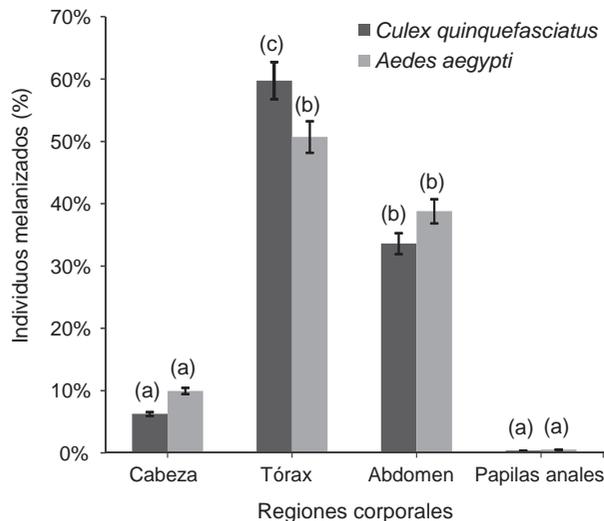
$gl=7$ ;  $p < 0,0001$ ) (cuadro 2). A partir de la dosis de 500:1, se obtuvieron las mayores cantidades de nematodos en ambas especies.

El mayor porcentaje de especímenes juveniles infectivos 'melanzados' se registró en el tórax de las larvas de *C. quinquefasciatus*, lo cual difirió significativamente del resto de las regiones corporales ( $F=20,37$ ;  $gl=3$ ;  $p < 0,0001$ ) (figura 5), en tanto que en *A. aegypti*, los mayores porcentajes se encontraron en el tórax y el abdomen, observándose diferencias significativas entre estas regiones corporales y las demás ( $F=11,53$ ;  $gl=3$ ;  $p < 0,0001$ ) (figura 5).

## Discusión

Los resultados de este trabajo evidenciaron que *C. quinquefasciatus* y *A. aegypti* son sensibles a diferentes dosis de *H. bacteriophora* N4 en condiciones de laboratorio. La muerte de las larvas ocurrió a partir de las 24 horas del contacto con los nematodos con las tres dosis más altas. La mortalidad larval superó el 70 % en ambos huéspedes y se incrementó con el aumento de la dosis. En *A. aegypti*, los mayores porcentajes de parasitismo se alcanzaron en menor tiempo.

Los porcentajes de mortalidad obtenidos con *C. quinquefasciatus* fueron inferiores a los de otro estudio en Egipto con *H. bacteriophora* (96 %), aunque en aquel se utilizó una dosis menor (300 especímenes juveniles infectivos por larva) a las del presente trabajo (30). En un estudio en Estados Unidos, se obtuvo 100 % de parasitismo en larvas de *C. pipiens* (21) empleando una dosis muy superior (6.000 especímenes juveniles infectivos por larva) de *H. bacteriophora*.



**Figura 5.** Porcentajes de especímenes juveniles infectivos de *Heterorhabditis bacteriophora* 'melanizados' en las distintas regiones corporales de *Culex quinquefasciatus* y *Aedes aegypti*. Las letras en las barras indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

En ensayos realizados en Argentina, no se registró parasitismo en *C. pipiens* ni *C. saltanensis* con dos aislamientos autóctonos de *H. bacteriophora*, uno de Río Negro y otro de Río Cuarto, con dosis de 500 y 1.000 especímenes juveniles infectivos por larva, respectivamente (22,23). En otros experimentos con *C. quinquefasciatus* y *Steinernema rarum* (OLI) en Córdoba, se observó también un incremento en la mortalidad larval al aumentar la dosis, con un porcentaje mayor (89 %) con las dosis más altas empleadas en este trabajo (Cagnolo S, Almirón WR. Susceptibilidad de larvas de *Culex quinquefasciatus* al parasitismo por *Steinernema rarum* (Nematoda: Steinernematidae) en condiciones de laboratorio. V Jornadas Regionales sobre Mosquitos. La Plata; 2007) y un porcentaje similar (75 %) en *C. apicinus* con una dosis menor (400 especímenes juveniles infectivos por larva) (24).

En contraste con los resultados de este trabajo, los valores de mortalidad de *C. quinquefasciatus* no superaron el 7 % con *S. carpocapsae* y *S. feltiae* provenientes de El Cairo en dosis entre 50 y 300 especímenes juveniles infectivos por larva (30). Los resultados en *A. aegypti* evidenciaron la misma tendencia que los obtenidos con otros aislamientos de *H. bacteriophora* N116 y *S. rarum* (OLI) de Córdoba, en los cuales la mortalidad se incrementó con el aumento de la dosis (Cagnolo SR, Rivero ME, Almirón WR. Susceptibilidad de larvas de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) al parasitismo por *Steinernema rarum* (OLI) (Nematoda: Steinernematidae), en condiciones de laboratorio. Nematropica. 2007;37: 142. Resúmenes de la XXXIX Reunión Anual de Onta. 29 de octubre-2 de noviembre, Villa Carlos Paz, Córdoba, Argentina). Las diferencias en la mortalidad según el estadio podrían atribuirse al hecho de que los nematodos son desechados como alimento en los estadios larvales tempranos

(Steinernematidae), en condiciones de laboratorio. Nematropica. 2007;37:142. Resúmenes de la XXXIX Reunión Anual de Onta. 29 de octubre-2 de noviembre, Villa Carlos Paz, Córdoba, Argentina) (20).

Las variaciones en los porcentajes de mortalidad obtenidos con los distintos aislamientos reflejarían diferencias intraespecíficas. Como se sabe, si bien los nematodos entomopatógenos poseen un amplio rango de huéspedes, distintos aislamientos pertenecientes a una misma especie pueden diferenciarse entre sí en cuanto a su capacidad infecciosa, lo cual probablemente estaría relacionado con su comportamiento (25), con la sensibilidad del insecto y con factores ambientales (26).

En este trabajo se obtuvo una  $DL_{50}$  más baja para *A. aegypti* que la obtenida para *C. quinquefasciatus*, lo cual indicaría una mayor virulencia de este aislamiento en *A. aegypti*. Se han obtenido valores de  $DL_{50}$  similares a los de este trabajo para *C. quinquefasciatus* con los aislamientos de *H. bacteriophora* (121,5 especímenes juveniles infectivos por larva) y *H. indica* (141,7 especímenes juveniles infectivos por larva) (30). Por el contrario, se obtuvieron valores inferiores de  $DL_{50}$  con *H. bacteriophora* (80 especímenes juveniles infectivos por larva) y en larvas de tercer y cuarto estadio con *C. pipiens* (63 especímenes juveniles infectivos por larva) (21). Por otro lado, la  $DL_{50}$  obtenida en este trabajo para *A. aegypti* difiere con lo registrado con *H. heliothidis* (141 especímenes juveniles infectivos por larva) y con *S. feltiae* (1,26 especímenes juveniles infectivos por larva) en este mismo díptero (19).

La mortalidad de las larvas de mosquitos, independientemente de la dosis, resultó mayor en el tercer estadio de desarrollo en las dos especies de huéspedes. En otros estudios se han obtenido resultados similares (19,20,21,24,30). Por el contrario, en un experimento con *S. rarum* (OLI), los mayores porcentajes de mortalidad en *A. aegypti* correspondieron a las larvas de segundo estadio (Cagnolo SR, Rivero ME, Almirón WR. Susceptibilidad de larvas de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) al parasitismo por *Steinernema rarum* (OLI) (Nematoda: Steinernematidae), en condiciones de laboratorio. Nematropica. 2007;37: 142. Resúmenes de la XXXIX Reunión Anual de Onta. 29 de octubre-2 de noviembre, Villa Carlos Paz, Córdoba, Argentina). Las diferencias en la mortalidad según el estadio podrían atribuirse al hecho de que los nematodos son desechados como alimento en los estadios larvales tempranos

del mosquito debido a su tamaño; en el caso de las larvas de segundo estadio, se ha sugerido que la pequeña abertura oral que poseen no les permitiría ingerir los nematodos enteros, sino que los triturarían con sus dientes mandibulares, causándoles la muerte (21). Los estadios larvales mayores podrían, por el contrario, ingerir los nematodos sin dañarlos, lo que resultaría en una mayor sensibilidad a la infección (21,31).

El engrosamiento de la pared cuticular en los estadios larvales más jóvenes de los mosquitos es reducido. Los especímenes juveniles infectivos de *Heterorhabditis* poseen una estructura cefálica que les permite perforar dicha pared, por lo que la penetración a través de la cutícula de los insectos representa una vía adicional de ingreso por las aberturas naturales (32). En este sentido, se ha señalado que los nematodos podrían ingresar en las larvas de segundo estadio por esta vía y provocar la muerte en los estadios posteriores mediante la proliferación de la bacteria simbiote (20).

En la presente investigación se evidenció que los estadios infectivos de *H. bacteriophora* N4 son capaces de ingresar a la cavidad del cuerpo de las larvas de ambas especies huéspedes y desarrollarse exitosamente, produciendo una nueva generación de especímenes juveniles infectivos. El número de nematodos adultos registrados fue mayor en *A. aegypti* con todas las dosis. Asimismo, la generación de nuevos especímenes juveniles infectivos al finalizar el ciclo parasitario, se observó a partir de la dosis de 100:1 en *A. aegypti* y solo en la dosis más alta en *C. quinquefasciatus*, lo cual coincide con lo registrado en otros trabajos (Cagnolo S, Almirón WR. Susceptibilidad de larvas de *Culex quinquefasciatus* al parasitismo por *Steinernema rorum* (Nematoda: Steinernematidae) en condiciones de laboratorio. V Jornadas Regionales sobre Mosquitos. La Plata; 2007) (20,24).

El mecanismo de melanización fue mucho más fuerte en *C. quinquefasciatus*, pues la mayoría de los nematodos que ingresaron a las larvas se 'melanizaron' con todas las dosis. En ambas especies la reacción defensiva se incrementó a medida que aumentó el número de nematodos que ingresaron en el cuerpo de los dípteros. Esto coincide con lo observado en *A. aegypti* con *H. bacteriophora* N116 (20) y con *S. rorum* (Cagnolo SR, Rivero M, Almirón WR. Respuesta inmunitaria de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) al parasitismo por nematodos entomopatógenos (Nematoda: Steinernematidae). 5º Jornadas Regionales sobre Mosquitos. Facultad

de Ciencias Naturales y Museo de La Plata. 4-5 de octubre de 2007. La Plata, Buenos Aires.). En *C. quinquefasciatus* se observaron resultados similares con *S. carpocapsae* y *S. feltiae*, pues la mayoría de los nematodos no pudieron desarrollarse en las larvas del mosquito y fueron 'melanizados' (30). Por el contrario, en ensayos realizados en *A. aegypti* con los nematodos *H. heliothidis* y *S. feltiae*, se observó que la reacción de melanización disminuyó al aumentar la cantidad de nematodos en el interior de las larvas (19). En *C. quinquefasciatus* el mayor porcentaje de especímenes juveniles infectivos 'melanizados' se observó en el tórax de las larvas, y en *A. aegypti* en el tórax y el abdomen, en concordancia con lo registrado con el aislamiento de *Heterorhabditis* N116 (20). Con *S. rorum* (OLI), los especímenes juveniles infectivos 'melanizados' se observaron principalmente en el abdomen de las larvas de *A. aegypti* (Peschiutta ML, Cagnolo S, Almirón WR. Respuesta inmune de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) al parasitismo de *Heterorhabditis* sp. (Nematodo: Heterorhabditidae. V Congreso Argentino de Parasitología. La Plata; 2009).

Los resultados obtenidos en este trabajo demuestran que *H. bacteriophora* N4 es capaz de matar a las larvas de las dos especies de mosquitos, aunque *A. aegypti* parecería ser más sensible que *C. quinquefasciatus*.

Los aislamientos de nematodos se consideran biotipos o razas que, en ocasiones, exhiben características biológicas significativamente diferentes (33), por lo cual se ha sugerido que con agentes autóctonos se lograría un mayor control biológico, dado que están ecológicamente adaptados al ambiente y a las plagas existentes en los ecosistemas donde se aplican (34).

La información obtenida en el presente estudio es importante porque demuestra la gran potencialidad de *H. bacteriophora* N4 como regulador biológico de larvas de *A. aegypti* y *C. quinquefasciatus* y, además, porque los ensayos se hicieron con un aislamiento autóctono, por lo cual sería interesante continuar la evaluación de dicho aislamiento en condiciones de campo, con el fin de determinar su capacidad infecciosa y su persistencia.

#### Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener conflicto de intereses.

#### Financiación

Este trabajo fue financiado por la Secretaría de Ciencia y Tecnología de la Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, Argentina.

## Referencias

1. **Almirón WR, Crocco L.** Mosquitos urbanos transmisores de dengue y encefalitis de San Luis. Manual de capacitación docente. Córdoba, Argentina: Ed. Universitas; 2007. p. 48.
2. **Santamarina-Mijares A, Pérez-Pacheco R, Martínez SH.** Susceptibilidad de las larvas de *Aedes aegypti* al parasitismo por *Romanomermis culicivorax* en condiciones de laboratorio y de campo en Oaxaca, México. Rev Panam Salud Pública. 2000;8:299-304. <https://doi.org/10.1590/S1020-49892000001000001>.
3. **Grech, M, Visintín A, Laurito M, Estallo E, Lorenzo P, Roccia I, et al.** New records of mosquito species (Diptera: Culicidae) from Neuquén and La Rioja provinces, Argentina. Rev Saúde Pública. 2012;46:387-9. <https://doi.org/10.1590/S0034-89102012005000007>
4. **Sabattini M.** Importancia actual de los arbovirus en Argentina. Sitio Argentino de Producción Animal. 2010;266:1-4.
5. **Ministerio de Salud de la Nación.** Fiebre chikunguña - Circulación viral en Bolivia y Paraguay. Fortalecimiento de la vigilancia y acciones de prevención en localidades fronterizas. Fecha de consulta: 11 de julio de 2016. Disponible en: <http://www.msal.gov.ar/images/stories/epidemiologia/alertas-2015/10-02-2015-alerta-1chikun.pdf>.
6. **Ministerio de Salud de la Nación.** Comunicación. OPS/OMS alerta por situación de fiebre amarilla. Fecha de consulta: 12 de julio de 2016. Disponible en: <http://www.msal.gov.ar/images/stories/epidemiologia/alertas-2016/05-05-2016-comunicacion-por-fiebre-amarilla.pdf>.
7. **Ministerio de Salud de la Nación.** Comunicación. Transmisión local de virus Zika en la Argentina. Fecha de consulta: 12 de julio de 2016. Disponible en: <http://www.msal.gov.ar/images/stories/epidemiologia/alertas-2016/26-02-2016-comunicacion-transmision-local-zika.pdf>.
8. **Organización Mundial de la Salud.** Dengue y dengue grave. Nota descriptiva. Fecha de consulta: 12 de julio de 2016. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/es/>.
9. **La Nación.** Dengue: alertan que hay un 70 % más de casos que en 2009. Fecha de consulta: 13 de julio de 2016. Disponible en: <http://www.lanacion.com.ar/1892515>.
10. **Sabattini MS, Avilés G, Monath TP.** Historical, epidemiological and ecological aspects of arboviruses in Argentina: Flaviviridae, Bunyaviridae and Rhabdoviridae. En: Travassos da Rosa AP, Vasconcelos PF, Travassos da Rosa JF, editores. An overview of arbovirology in Brazil and neighbouring countries. Belem, Pará, Brasil: Instituto Evandro Chagas; 1998. p. 113-34.
11. **Spinsanti L, Basquiera A, Bulacio S, Kim S, Somale V, Ré V, et al.** St. Louis encephalitis in Argentina: The first case reported in the last seventeen years. Emerg Infect Dis. 2003;9:271-3. <https://doi.org/10.3201/eid0902.020301>
12. **Díaz LA, Almirón WR, Ludueña-Almeida F, Spinsanti LI, Contigiani MS.** Vigilancia del virus encefalitis de San Luis y mosquitos (Diptera: Culicidae) en la provincia de Córdoba, Argentina. Entomología y Vectores. 2003;10:551-66.
13. **Ministerio de Salud de la Nación.** Brote de encefalitis de San Luis en Pergamino. Fecha de consulta: 11 de julio de 2016. Disponible en: <http://www.msal.gov.ar/images/stories/epidemiologia/alertas-2015/24-04-2015-alerta-casos-encefalitis-san-luis.pdf>.
14. **Enría DA, Morales MA.** Temas de Zoonosis IV. Virus del Oeste del Nilo: su emergencia en las Américas. Fecha de consulta: 12 de julio de 2016. Disponible en: <http://repositorio.anlis.gov.ar/xmlui/bitstream/handle/123456789/529/RevistaVeterinariaArgentina,2010,XXX,303..pdf?sequence=1>.
15. **Solis-Rojas C.** Alternativas diversas para el combate y optimización de estrategias en el manejo de mosquitos culicidos en la zona metropolitana de Monterrey N. L. México (tesis). San Nicolás de Los Garza, Nuevo León: Universidad Autónoma de Nuevo León; 2000.
16. **Adams BJ, Nguyen KB.** Taxonomy and systematic. En: Gaugler R, editor. Entomopathogenic Nematology. Wallingford, UK: CAB International; 2002. p. 1-33.
17. **Lewis EE, Campbell J, Griyn CH, Kaya H, Peters A.** Behavioral ecology of entomopathogenic nematodes. Biological Control. 2006;38:66-79. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2005.11.007>
18. **Gaugler R, Kaya HK.** Entomopathogenic nematodes in biological control. Boston: CRC Press; 1990. p. 365.
19. **Molta NB, Hominick WM.** Dose- and time-response assessments of *Heterorhabditis heliothidis* and *Steinernema feltiae* (Nematoda: Rhabditida) against *Aedes aegypti* larvae. Entomophaga. 1989;34:485-93. <https://doi.org/10.1007/BF02374386>
20. **Peschitta ML, Cagnolo SR, Almirón WR.** Susceptibility of larvae of *Aedes aegypti* (Linnaeus) (Diptera: Culicidae) to entomopathogenic nematode *Heterorhabditis bacteriophora* (Poinar) (Rhabditida: Heterorhabditidae). Rev Soc Entomol Argent. 2014;73:99-108.
21. **Poinar GO Jr, Kaul HN.** Parasitism of the mosquito *Culex pipiens* by the nematode *Heterorhabditis bacteriophora*. J Invertebr Pathol. 1982;39:382-7. [https://doi.org/10.1016/0022-2011\(82\)90063-5](https://doi.org/10.1016/0022-2011(82)90063-5)
22. **de Doucet MM, Giayetto AL.** Gama de huéspedes y especificidad en *Heterorhabditis bacteriophora* Poinar (Heterorhabditidae: Nematoda). Nematología mediterránea. 1994;22:171-7.
23. **de Doucet MM, Bertolotti MA, Giayetto AL, Miranda MB.** Host range, specificity, and virulence of *Steinernema feltiae*, *Steinernema rarum*, and *Heterorhabditis bacteriophora* (Steinernematidae and Heterorhabditidae) from Argentina. J Invertebr Pathol. 1999;73:237-42. <https://doi.org/10.1006/jipa.1998.4831>
24. **Cagnolo SR, Almirón WR.** Capacity of the terrestrial entomopathogenic nematode *Steinernema rarum* (Rhabditida: Steinernematidae) to parasitize *Culex apicinus* larvae (Diptera: Culicidae). Rev Soc Entomol Argent. 2010;69:141-5.
25. **Fairbairn JP, Fenton A, Norman RA, Hudson PJ.** The invasion efficiency of the entomopathogenic nematode *Steinernema feltiae* (Rhabditidae: Steinernematidae). Asp Appl Biol. 1999;53:83-8.
26. **El Sadawy HA, Saleh MM.** Infectivity of Egyptian and imported entomopathogenic nematodes under different temperatures. International Journal of Nematology. 1999;9:72-5.
27. **Kaya HK, Stock SP.** Techniques in insect nematology. En: Lacey L, editor. Manual of techniques in insect pathology. Londres, UK: Academic Press; 1997. p. 281-324.

28. **Domínguez, CM, Ludueña-Almeida F, Almirón WR.** Dinámica poblacional de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) en Córdoba Capital. Revista de la Sociedad Entomológica Argentina. 2000;59:41-50.
29. **Di Rienzo JA, Casanoves F, Balzarini MG, González L, Tablada M, Robledo CW.** InfoStat versión 2013. Grupo InfoStat. Córdoba: Universidad Nacional de Córdoba; 2013.
30. **Zohdy NM, Shamseldean MM, Abd-El-Samie EM, Hamama HM.** Efficacy of the Steinernematid and Heterorhabditid nematodes for controlling the mosquito, *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae). Journal of Mosquito Research. 2013;3:33-44. <https://doi.org/10.5376/jmr.2013.03.0005>
31. **Dadd RH.** Size limitations on the infectivity of mosquito larvae by nematodes during filter-feeding. J InvertebrPathol. 1971; 18:246-51. [https://doi.org/10.1016/0022-2011\(71\)90152-2](https://doi.org/10.1016/0022-2011(71)90152-2)
32. **Bedding RA, Molyneux AS.** Penetration of insect cuticle by infective juveniles of *Heterorhabditis* spp. (Heterorhabditidae: Nematoda). Nematologica. 1982;28:354-9.
33. **Baker GL, Capinera JH.** Nematodes and nematomorphs as control agents of grasshoppers and locusts. Memories of the Entomological Society of Canada. 1997;171:157-211. <https://doi.org/10.4039/entm129171157-1>
34. **Poinar GO Jr.** Taxonomy and biology of Steinernematidae and Heterorhabditidae. En: Gaugler R, Kaya HK, editors. Entomopathogenic Nematodes in Biological Control. Boca Raton: CRC Press; 1990. p. 23-61.